

**СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ ПО  
ОНКОЛОГИЯ**

София

Клиника по Медицинска онкология

Д-р Маргарита Стоянова Таушанова

Тройно негативен карцином на млечната жлеза -  
молекулярно-биологична характеристика, диагностика и  
възможности за лечение

**Автореферат**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна  
степен

“ДОКТОР„

Научен ръководител

Проф. д-р Константа Велинова Тимчева, д.м.

София 2013

---

## Съдържание

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ: .....	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	9
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	19
V. ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	68
VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	70
VII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	71
VIII. БЛАГОДАРНОСТИ.....	73

### ***Съкращения, използвани в дисертацията***

КМЖ - карцином на млечната жлеза

ТНКМЖ - тройно негативен карцином на млечната жлеза

pCR - пълен патоморфологичен отговор

ИХХ - имунохистохимично изследване

ER - естрогенни рецептори

PR - прогестеронови рецептори

HER2 - рецептор за човешкия епидермален растежен фактор 2

VEGF - съдово ендотелен растежен фактор

EGFR – рецептор за епидермалния растежен фактор

CAV - кавеолин

СЗП - свободна от заболяване преживяемост

ОП - обща преживяемост

ЧКР - честота на клиничните ремисии

СПП – свободна от прогресия преживяемост

ПБР-преживяемост без рецидив

ХТ - химиотерапия

ЛЛ - лъчелечение

КТ - компютърна томография

ЯМТ - ядрено магнитна томография

G1 - ниска степен на малигненост

G2 - умерена степен на малигненост

G3 - висока степен на малигненост

ASCO - Американско общество по клинична онкология

ESMO - Европейско общество по медицинска онкология

NCCN-Национален ракова система на САЩ

FEC - 5-Фу+фарморубицин+циклофосфамид

TAC - доцетаксел+доксорубицин+циклофосфамид

AC - доксорубицин+циклофосфамид

CMF - циклофосфамид+MTX+5ФУ

CEF - циклофосфамид+епирубицин+5ФУ

BL1,2 - базално клетъчен тип 1,2

IM - имуномодулиран тип

M - мезенхимален тип

MSL – мезенхимално-стволов тип

LAR - луминален-андроген рецепторен тип

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на млечната жлеза (КМЖ) е проблем с огромна социална значимост. През последните 25 години неговата честота се увеличава с 30%, като се регистрират 1.4 милиона нови случая годишно. В България КМЖ е 22.8% от всички онкологични заболявания, честотата му непрекъснато нараства.

С широкото навлизане на генетичния анализ се установи, че карциномът на млечната жлеза е хетерогенно заболяване с разнообразна молекулярна и биологична характеристика. Въведоха се нови типове с определена диагностична и прогностична стойност. Един от тях е тройно негативният карцином на млечната жлеза, характеризиращ се с ER, PR, HER2 негативен статус. Първите съобщения за него са публикувани през 1997 г., но едва през 2002 г. се отделя като самостоятелен тип КМЖ.

ТНКМЖ се среща три пъти по-често при жени от афро-американската раса, при болни с по-лош социално-икономически статус. Констатирано е, че засяга жени в перименопаузална възраст и по време на менопаузата.

Етиологичните фактори, свързани с развитието на ТНКМЖ, са разнообразни и не напълно ясни. Предполага се връзка със затлъстяването, репродуктивния статус, някои вредни навици. Тези причини не са убедително потвърдени. Връзката с класическите рискови фактори за поява на карцином на гърдата при ТНКМЖ все още не е ясна, което налага още много проучвания в тази област.

Биологичната характеристика на този тумор непрекъснато се обогатява. Доказано е, че съществува значително припокриване между ТНКМЖ и базалноклетъчният рак, но те не са идентични. Причината за хетерогенността е различната генна експресия. Следователно генетичният подпис детерминира различните подтипове на този тумор: два базалноклетъчни (BL1, BL2), имуномодулиран (IM), мезенхимален (M), мезенхимално-стволов (MSL), луминален-андроген рецепторен (LAR). Всеки от тези подтипове се характеризира с определени

биомаркери, активирани на различни сигнални пътища, което е предпоставка за специфична прицелна терапия. Идентифицирането на клетъчни линии, съответстващи на тройно негативните подтипове тумори, предоставя ключови модели за предклинични проучвания на нови лекарствени средства.

Провеждането на генетичен анализ не винаги е възможно. Това налага извършване на имунохистохимично изследване на молекулярни маркери с оглед оценка както на прогнозата, така и за оптимизиране на лечението. Има установен панел маркери за ТНKMЖ ( CK5/6, CK14, ki67, EGFR ), но той не е строго определен и непрекъснато се обогатява. Откриването на нови биомаркери, достатъчно чувствителни и специфични за ТНKMЖ, е изключително важно както за диагностиката, така и за оптимизиране на терапията.

Увреждането на BRCA1 и други гени, участващи в репликацията на ДНК, също има отношение към лечението и прогнозата на ТНKMЖ. Мутацията е непосредствено свързана както с поява на наследствения рак на млечната жлеза, така и в значителен процент от болните - с ТНKMЖ ( 75-90%). При настъпилото генно увреждане се нарушава клетъчния цикъл, повишава се чувствителността към лечение с алкилиращи агенти, платина и PARP1 инхибитори. Рутинно изследване на генната мутация е невъзможно, налага се да се прецизират болните, нуждаещи се от генетичен тест. За да се преодолее това затруднение, биха могли да се използват косвени данни за предполагаема BRCA1 мутация чрез определяне на някои биологични маркери по имунохистохимичен метод.

Особеностите в клинично протичане на ТНKMЖ са диагностициране в напреднал стадий, ранни локални рецидиви, по-често органно метастазиране и кратка обща преживяемост. Агресивният ход на заболяването изисква прецизна диагностика, както и активно проследяване, целенасочени изследвания, търсещи ранното разпространение на болестта.

Лечението на тройно негативния карцином на млечната жлеза не се отличава от това на другите тумори на гърдата, включващо оперативно, лъче- и лекарствено лечение.

Стандартните химиотерапевтични режими намират основно приложение при пациенти с тройно негативен карцином на млечната жлеза. Приложението на адювантна химиотерапия с антрациклини и таксани е с доказан ефект по отношение на удължаване на общата преживяемост при тези болни. Дори и наличие на един рисков фактор налага използване на тези терапевтични режими. Лечението на метастазирало заболяване е затруднено от липсата на задоволителен ефект от прилаганите терапевтични методи. Това изисква изключително прецизиране на лекарствените средства, съобразени със съответния подтип тройно негативен карцином. Въвеждането на нови медикаменти в терапията би довело до подобвяване на лечебните резултати.

Съвременната онкологична наука се стреми да прилага индивидуален подход към всеки пациент, което налага точна диагноза, правилен избор на лечение и алгоритъм на проследяване.

Нерешените проблеми в диагностиката и лечението на тройно негативния карцином на млечната жлеза предопредели темата на нашата разработка. Тя е свързана с диагностично и терапевтично прецизиране на поведението при това заболяване. Получените резултати могат да послужат като научна основа за приложението на диагностичен и терапевтичен алгоритъм при този особено агресивен тумор на млечната жлеза.

## **II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ**

Цел на настоящия научен проект е оптимизиране на диагностиката и терапевтичния подход при болни с ТНКМЖ чрез изследване на панел от молекулярни маркери, както и генни мутации, характеризиращи биологията на този изключително агресивен злокачествен тумор.

За постигане на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Определяне на основни характеристики на група болни с ТНKMЖ с оглед прецизиране на диагностиката и терапевтичния подход.

2. Оценка на връзката между някои прогностични белези и появата на метастази с цел подобряване на стратегията за комплексно лечение при този вид злокачествен тумор на млечната жлеза.

3. Определяне на свободната от заболяване преживяемост (СЗП) при пациентки, на които е приложено адювантно лечение с антрациклин-таксан съдържаща химиотерапия, в сравнение със СЗП при болни, получили само антрациклини или с група болни, не провеждали адювантна терапия.

4. Определяне на средната преживяемост без прогресия (СПП) при добавяне на Bevacizumab към таксан-съдържаща химиотерапия с оглед оценка на ефекта на прилаганата комбинация като първа линия лечение при метастазирало заболяване.

5. Изследване на имунохистохимични маркери характерни за болни с ТНKMЖ. Определяне на прогностичната им стойност с оглед избора на най-подходящ терапевтичен подход.

6. Определяне честотата на молекулярните маркери при група болни с доказана BRCA1 мутация с оглед косвена оценка на вида на тумора при невъзможност за провеждане на генетичен тест.

7. Създаване на примерен диагностичен алгоритъм за изследване на молекулярни маркери при тройно негативния карцином на млечната жлеза с цел определяне на прогнозата при болни с това заболяване.

8. Приложение на посочените диагностични методи за оценка на прогнозата при болни с тройно негативен карцином на млечната жлеза.

9. Оптимизиране на терапевтичния подход въз основа на получените резултати от изследваните молекулярни маркери при болни с ТНKMЖ, включително тези с малък размер на тумора или с негативни лимфни възли.



### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследването се проведе в Клиника по медицинска онкология на СБАЛ по Онкология, София за периода от 2005 г. до месец март 2013 г.

Включените в проучването болни са от женски пол с хистологично доказан карцином на млечната жлеза и установен отрицателен рецепторен статус за ER, PR, и HER2.

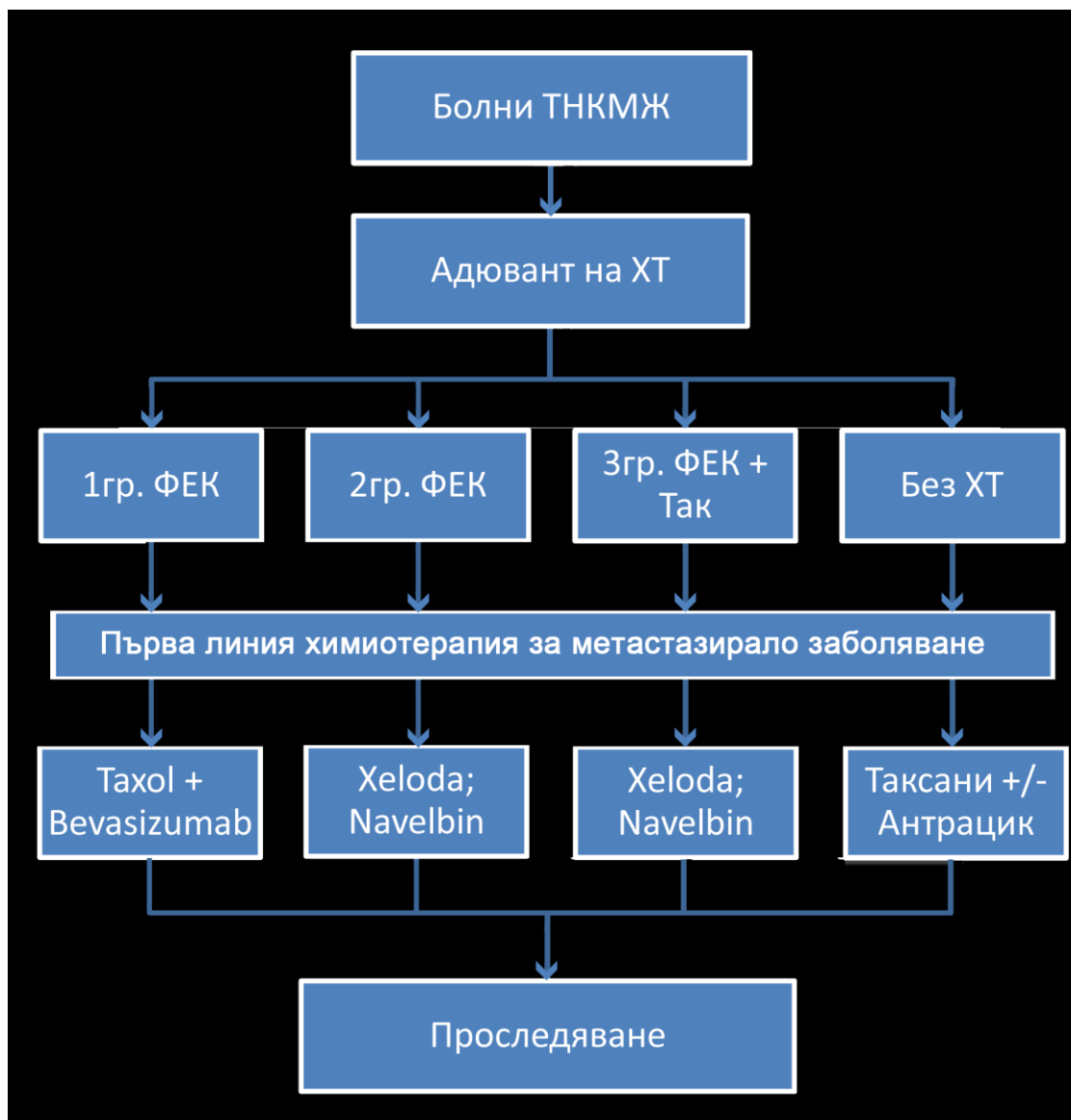
Проследени са 130 жени с хистологично и имунохистохимично доказан карцином на млечната жлеза, ER, PR, HER2 негативен. При болните е извършено оперативно, лъчелечение, проведена е и адювантна химиотерапия. При 100 от болните е доказано метастазирало заболяване с рутинните методи за диагностика. Тези болни са разделени в групи според вида на проведената адювантна химиотерапия.

При двадесет от болните е проследен ефектът от първа линия химиотерапия с Paclitaxel и Bevasizumab - отчетена е свободната от заболяване преживяемост (СЗП).

С оглед прецизиране на прогностичните маркери се извърши сравнение с група от 30 болни с неметастазирало заболяване, проследени в периода от 2007г. до месец март 2013г. Те са провеждали адювантна химиотерапия в комбинация с антрациклини и таксани. Не е доказано към посочения момент метастазирание на заболяването.

Изследван е панел от 7 молекулярни маркери с имунохистохимичен метод при 64 болни с оглед проследяване на честотата им при тройно негативния карцином на млечната жлеза и връзката им с BRCA1 мутация, доказана при 10 от тях.

**Фиг. 1. Дизайн на клиничното проучване**



## **КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ**

В проучването взеха участие 130 жени (100 с метастазирало и 30 с неметастазирало заболяване). Таргетната популация пациентки отговаря на следните включващи критерии:

- Възраст  $\geq$  на 18 години
- Оперирани за рак на млечната жлеза

- Хистологично потвърден тумор
- Определена степен на малигненост
- Посочен брой изследвани и засегнати от метастази лимфни възли

възли

- Доказан имунохистохимично негативен ER, PR, HER2 рецепторен статус

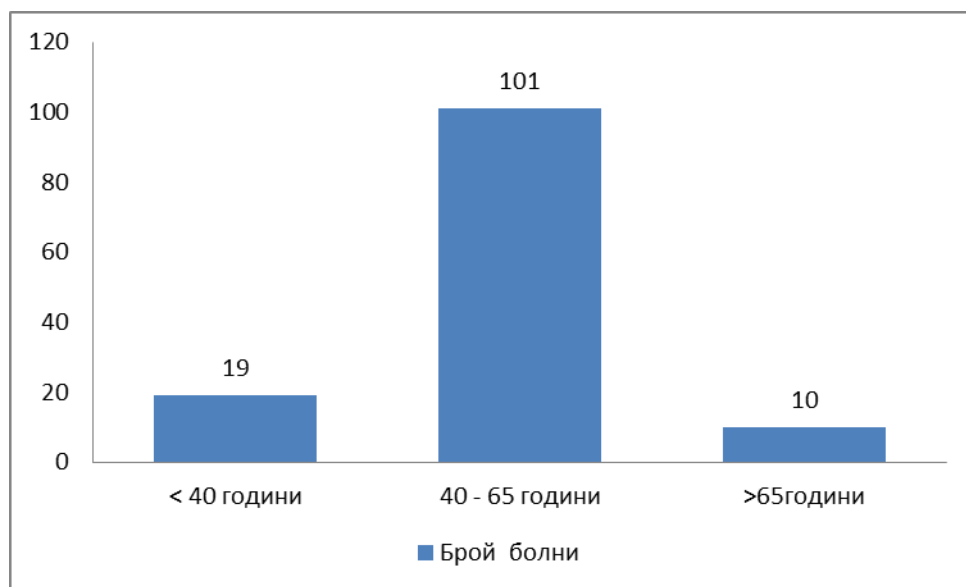
- Стадирани по TNM-класификацията
- Подлежащи на адювантна химиотерапия, радиотерапия или непровеждали адювантно лечение според стадия на заболяването.

За определяне на основните характеристики на болните с ТНКМЖ при българската популация се проследиха 6 основни показателя:

*а) Възраст*

Възрастовият диапазон на жените е от 25 до 75 години. Разделени са на три групи според този показател.

**Фиг. 2. Брой болни с ТНКМЖ, разпределени по възрастови категории**



*б) Стадий на заболяването*

Извършено е разделяне според стадия на заболяването, като е сравнена честотата между I; IIa и IIb; IIIa, b

*в) Големина на първичния тумор*

Болните са разделени в три групи: с тумор, по-малък или равен на 2 см, болни с тумор, по-голям от 2 см и болни, при които не е определен размера на тумора.

*г) Степен на малигненост*

Разпределението е отново в три групи, като първата е със степен на малигненост G1; втората – G 2-3; трета група – със степен на малигненост, която не може да се определи.

*д) Лимфни възли*

Разпределението на болните се извършва на база общ брой изследвани лимфни възли и засегнатите от тях с метастази, както и на броя болни с повече от 1 метастатичен лимфен възел.

*е) Хистологичен вид*

Разпределението е извършено между най-често срещаните хистологични видове при карцинома на млечната жлеза: инвазивен дуктален, инвазивен лобуларен, дукто-лобуларен и други хистологични видове.

С цел определяне на ефекта от провежданата адювантна химиотерапия по отношение на свободната от заболяване преживяемост (СЗП), болните са разделени в 4 групи:

• *Първа и втора група болни* - провеждали адювантна химиотерапия с антрациклини:

ФЕК (Фарморубицин, 5-Флуороурацил и Циклофосфамид), приложени интравенозно на всеки 3 седмици:

Фарморубицин - 75-90мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни

5-Флуороурацил - 500мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни

Циклофосфамид - 500мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни

Комбинацията ЦМФ е провеждана при противопоказания за лечение с антрациклини:

Циклофосфамид - 500мг/м<sup>2</sup>; 1-8 ден i. v/ 21 дни

Метотрексат - 40мг/м<sup>2</sup>; 1-8 ден i. v/ 21 дни

5-Флуороурацил - 500мг/м<sup>2</sup>; 1-8 ден i. v/ 21 дни

• *Трета група:* болни, провеждали адювантна химиотерапия с антрациклини и таксани: 3-4 курса ФЕК, последвани от 3-4 курса Паклитаксел/ Доцетаксел, приложени интравенозно:

Фарморубицин- 75-90мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни

5-Флуороурацил- 500мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни

Циклофосфамид- 500мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни,  
последвана от приложение на Паклитаксел - 175мг/м<sup>2</sup> или  
Доцетаксел - 75-100 мг/м<sup>2</sup> i. v/ 21 дни.

• *Четвърта група болни:* не провеждали адювантна химиотерапия.

**Табл. 1. Разпределение на болните според вида проведена адювантна и първа линия химиотерапия за метастазирало заболяване:**

Групи	1-група	2-група	3-група	4-група
Адювантна ХТ	FEC	FEC	FEC+Таксан	Не провеждали химиотерапия
Първа линия ХТ	Таксол+ Bevasizumab	Xeloda/ Navelbin	Xeloda/ Navelbin	Антрациклин+/ Таксан

С цел определяне на ефекта от проведената първа линия химиотерапия с комбинацията Паклитаксел + Бевацизумаб, са проследени 20 болни от първа група. Приложена е следната лекарствена комбинация до прогресия на заболяването:

Паклитаксел - 80мг/м<sup>2</sup> i. v. - 1, 8, 15 ден + Бевацизумаб - 10мг/кг i. v. -1, 15 ден

Болните от 2 и 3 група са провели първа линия ХТ за метастазирало заболяване с Xeloda /Navelbin, а болните от 4 група са провели първа линия ХТ с таксани и/или антрациклин.

**Табл. 2. Характеристики на болните с метастазирал ТНKMЖ:**

<b>Възраст</b>	< от 40 години	40-65 години	> 65 години
<b>Стадий на заболяването</b>	I (T1N0M0)	IIa (T0-2, N0-1, M0) IIb (T2-3N1M0)	IIIa (T0-3, N2, M0); IIIb(T4N0-2, M0)
<b>Големина на първичния тумор</b>	</= 2 см	> 2 см	Не може да се определи
<b>Степен на малигненост</b>	G1	G 2-3	Не може да се определи
<b>Лимфни възли</b>	Общ брой изследвани	Брой метастазирани	Болни с метастазирал повече от 1 лимфен възел
<b>Хистологичен вид</b>	Инвазивен дуктален	Инвазивен лобуларен	Инвазивен дукто-лобуларен
<b>Вид операция</b>	Мастектомия	Квадрантектomia	Други
<b>Вид адювантна ХТ</b>	FEC	FEC+Таксол	Не провеждали

<b>Метастазиране</b>	Висцерални	Костни	Контралатерална млечна жлеза
<b>Вид първа линия ХТ</b>	Таксол+ Bevasizumab	Xeloda/Navelbin	Таксони+/- Антрациклин

С цел определяне честотата на молекулярните маркери при болните с тройно негативен карцином на млечната жлеза е проведено имунохистохимично изследване при 64 пациентки. Избран е панел от 7 молекулярни маркери с диагностична и прогностична стойност.

**Табл. 3. Вид молекулярни маркери, изследвани имунохистохимично:**

<b>Вид маркер</b>	<b>ТНKMЖ (по литературни данни)</b>	<b>Прогностична и предиктивна стойност</b>
CK5/6	базален тип - 75%	+
CK14	базален тип - 74%	+
VEGF	базален тип - 34%	+
EGFR	базален тип - 45% - 60%	+
Ki67	при базален тип с мут. на p53	+
CAV1	до 13. 4%	+
AR /андрогенни рецептори/	25% - 45%	+

С оглед търсене на корелация между молекулярните маркери при ТНKMЖ и доказана мутация в BRCA1 гена са изследвани 10 жени за посочените маркери при доказана с генетични тестове мутация.

За оптимизиране на терапевтичния подход при болни с тройно негативни тумори без ангажиране на лимфни възли са проследени 30 болни (T1-2N0M0). Периодът на тяхното наблюдение е от 2007г. до месец март 2013г. Провели са

адювантна химиотерапия с 3-4 цикъла FEC и 3-4 цикъла с таксан (Paclitaxel/Docetaxel).

При провеждане на проучването са спазени правилата на добрата клинична практика.

Пациентките са подписали информирано съгласие за провеждане на химиотерапията и генетичното изследване, а за имунохистохимично изследване е получено устно съгласие.

### **Източници на данни и информация**

- История на заболяването;
- Епикризи;
- Фиш за патологоанатомично изследване;
- Фиш за имунохистохимично изследване на рецепторния статус;
- Амбулаторна карта за нанасяне на данни от контролни прегледи при проследяване на пациентките;
- Данни от Националния раков регистър и др.;

На всички пациентки е снета подробна анамнеза, осъществени са клинични прегледи от лекуващия лекар в клиниката - преди и по време на провежданите терапии.

### **ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ**

а) Лабораторни методи: ПКК, биохимия, туморен маркер СА15-3.

б) Образни диагностични методи: рентгенография на бял дроб, ехография на коремни органи, КАТ, ЯМТ, костна сцинтиграфия.

в) Патоморфологична хистологична верификация.

г) Имунохистохимично изследване на рецепторен статус, CISH - за изследване на HER2 при необходимост от уточняване на HER2/+/-, имунохистохимично изследване на молекулярни маркери.



Целта на това изследване е идентифициране на клетъчни или тъканни антигени, маркирани с моноклонални антитела и имунохистохимична техника. Принципът на процедурата се базира на маркиране на хистологични срези с първични моноклонални миши антитела. Антитялото се свързва специфично към съответни антигени. Така протеклата антиген-антитяло реакция се амплифицира чрез последователно прилагане на биотинирани антитела, специфични за миши имуноглобулини и последваща инкубация с комплекс от стрептавидин и биотинирана пероксидаза. Реакцията се визуализира чрез разтвор на хромогенен пероксидазен субстрат.

Използвана е автоматизирана система LeicaBondMax.

Резултатите се отчитат чрез микроскопско изследване. Като положителна реакция се приема наличието на грануларно кафяво цитоплазмено, мембранно или ядрено оцветяване при липса на цветен продукт в отрицателните контроли и междуклетъчното пространство. Ядрата са контраоцветени в синьо.

**Табл. 4. Използвани антитела при имунохистохимичното изследване на молекулярните маркери при болните с ТНКМЖ**

Антитяло	разреждане	НIER	Каталожен номер	Фирма-производител
CK14, Clone LL002	1 / 20	pH 6	NCL-L-LL002	Leica
Caveolin-1, Clone4D6	Готово за употреба	pH 6	NCL-Caveolin-1	Leica
Cytokeratin 5/6, Clone D5/16 B4	1 / 100	pH 8	M723729	DAKO
Ki-67 Antigen, Clone MIB-1	1/100	не	M724029	DAKO
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Clone VG1	1 / 50	pH 8	M727329	DAKO

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Clone E30	1 / 50	pH 6	M723901	DAKO
Androgen Receptor, Clone AR441	1 / 75	pH 8	M356201-2	DAKO

## ***ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ***

Генетичните тестове за носителство на BRCA1 мутации са утвърдени в скрининговите програми за ранна диагностика и профилактика на рака на гърдата в много европейски страни, но все още не са въведени у нас.

Анализът е извършен чрез директно секвениране с помощта на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Получените резултати са анализирани със софтуерна програма SecScape.

## ***ЛЕЧЕБНИ МЕТОДИ***

Прилагани са различни цитостатични комбинации в точно определени дози и честоти. Посочените комбинации са отразени в описанието на съответните групи пациенти.

## ***СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ***

Използвани са следните статистически методи:

Описателни методи:

1. Честотен анализ на качествени промени, който включва абсолютни и кумулативни честоти в проценти.
2. Графичен анализ.
3. Алтернативен анализ - използван е за оценка и сравняване на относителния дял.

4. Вариационен анализ на количествените промени - средна стойност, стандартно отклонение, минимум и максимум.

5. Корелационен анализ - за проследяване на зависимостите са използвани параметричен коефициент на корелация на Pearson и непараметричен коефициент на Spearman.

6. Методи за проверка на хипотезите - непараметрични методи, извършващи се с помощта на критерий  $\chi^2$  за търсене на зависимост между две качествени променливи с прието ниво на значимост  $p < 0,05$ .

Резултатите от проучването са статистически обработени с помощта на софтуерен продукт SPSS v13 for Windows.

## **IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

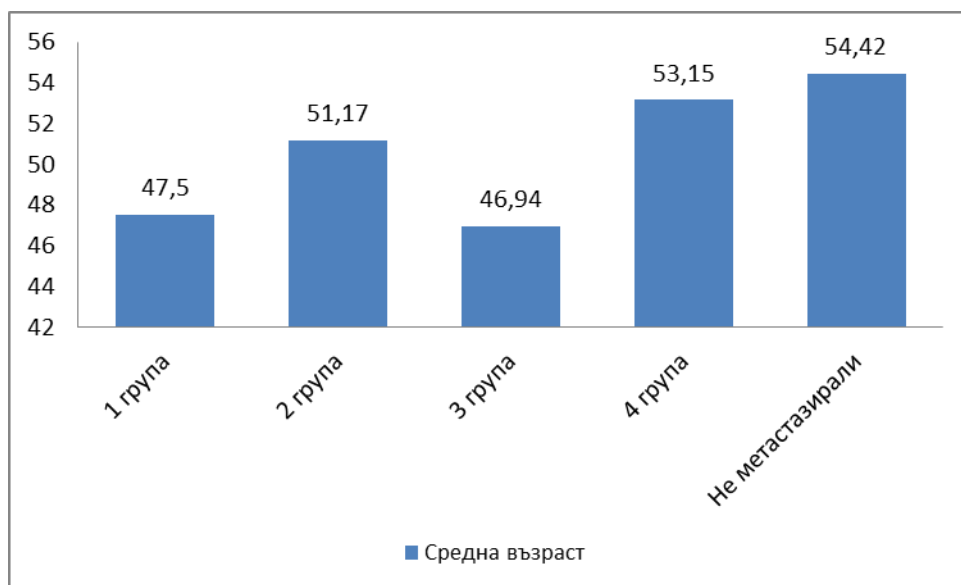
**Задача № 1:** *Определяне на основни характеристики на група болни с ТНКМЖ с оглед по-доброто прецизиране на диагностиката и терапевтичния подход.*

При анализа на проследените 130 болни с метастазирал и неметастазирал тройно негативен карцином на млечната жлеза се установиха следните характеристики:

### **1) Възrastова честота**

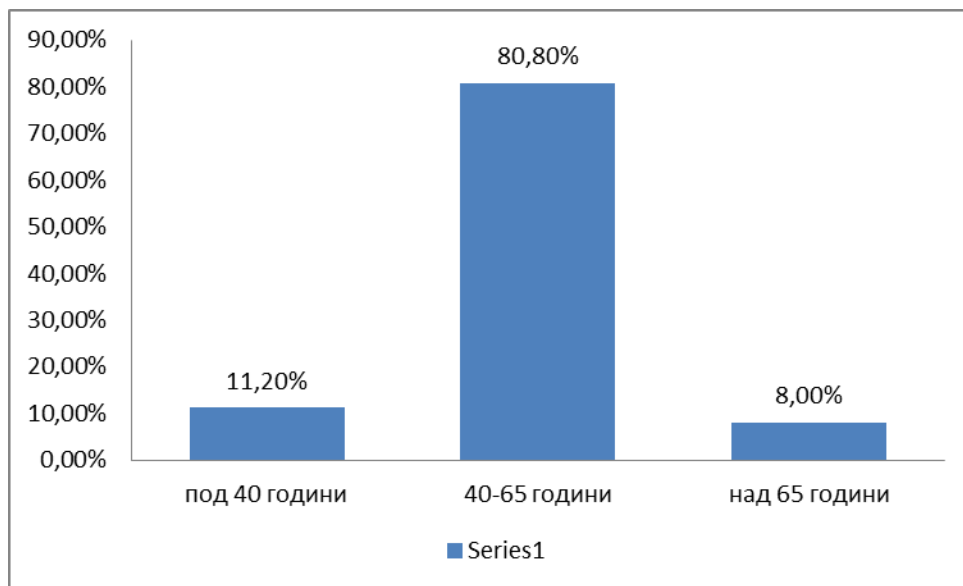
Наблюдаваната средна възрастова честота при болните е 51,16 ( +/-10, 393) години. Минималната възраст е 25, а максималната - 74 години. Болните от 4 групи с метастазирал ТНКМЖ се сравняват по показателя възрастова честота с 30 болни, които са провели адювантна ХТ, но не са метастазирали.

**Фиг. 3. Разпределение по възрастова честота в четирите групи метастазирал ТНКМЖ, сравнени с група болни с неметастазирал ТНКМЖ**



Средната възрастова честота на пациентите в групите не се различава статистически значимо ( $p=0,061$ ), т.е. групите са хомогенни по отношение на възрастта.

**Фиг. 4. Разпределение по възрастови категории на болни с ТНКМЖ**



**Табл. 5. Разделение по възрастови категории в групите болни с ТНКМЖ**

години	1 гр.	2 гр.	3 гр.	4 гр.	не метастазирали болни
под 40 г.	25, 0 %	11, 1 %	18, 7 %	5, 0%	3, 2 %
40-65 г.	75, 05	83, 35	81, 35	80, 0%	80, 6%
над 65 г	0. 0 %	5, 6%	0%	15, 0 %	16, 1%

Анализът на този показател сочи, че най-често ТНКМЖ възниква във възрастта на пери- и по време на менопаузата.

*Възрастовата честота* на нашите пациентки с метастазирал ТНКМЖ е 51, 16 (+/- 10,393) години. Разглеждането на показателя в групите с различна адювантна химиотерапия е в същия диапазон и не се различава статистически значимо ( $p=0,061$ ). Разделянето на болните в три групи по възраст показва, че най-голям е процентът на метастазирал ТНКМЖ във възрастовия интервал между 40-65 години. С оглед на неговата оценка се извърши сравняване на групата на метастазирали болни с групата от 30 болни с неметастазирало заболяване. Там средната възрастова честота е малко по-висока - 54,42 години. Нашето проучване показва, че

ТНКМЖ възниква преобладаващо при постменопаузални жени, като има тенденция за висока честота в перименопаузата.

Най-близко сходство до получените от нас данни се установява в анализа на Tanja O., et all. 2011 от института в Любляна, където са проследени 269 болни с ТНКМЖ. Средната възрастова честота е 55,3, наблюдавана за 5,9 години. При този анализ се установява зависимост между възрастта като самостоятелен прогностичен маркер и свободната от заболяване преживяемост (СЗП) - ( $p < 0,001$ ).

Сходни са данните и на Университета в Тексас (MD Anderson Cancer Center) при описаните 1000 болни, като честотата е най-висока при 53,5 годишна възраст.

С оглед на расовите особености и появата на ТНКМЖ е проведен анализ на рисковите фактори за възникването му при жени в Китай - 1800 болни. Авторите посочват, че няма разлика в този показател при ТНКМЖ и не-ТНКМЖ.

В подкрепа на нашата констатация са данните от голям анализ на жени с ТНКМЖ от Alone et all., 2011, който посочва средна възраст за възникване на заболяването - 50,8 години, а при другите подтипове - 55,0 години ( $p < 0,0001$ ). За basal-like ТНКМЖ тази стойност е 50,9; basal-like не-ТНКМЖ - 50,7 г ( $p < 0,05$ ). В 26,5% ТНКМЖ са при жени на възраст над 60 години.

Връзката на показателя възраст и честотата на рецидивите при ТНКМЖ е също важна. Техният процент е значително по-висок в сравнение с останалите тумори на млечната жлеза. В проучването на Института в Любляна е констатирано, че при болни над 65 години рискът от рецидив е с 1.79 пъти по-висок в сравнение с по-млади болни (95%,  $p = 0,012$ ). Този факт се обяснява вероятно с проведеното по-агресивно лечение при по-младите жени за разлика от по-щадящата терапия при по-възрастните.

## 2) Хистологичен вид.

Според хистологичния вид се констатира, че преобладава инвазивният дуктален карцином - 50,1%, следван от инвазивен дукто-лобуларен - 20,0%; инвазивен лобуларен - 5%, други видове - 25%.

**Табл. 6. Честота на хистологичните видове при болни с ТНКМЖ**

Хистологичен вид	Честота (%)
Инвазивен дуктален	50.1 %
Инвазивен дукто-лобуларен	20.0 %
Инвазивен лобуларен	5 %
Други	25 %

**Табл. 7. Честота на хистологичните видове при болни с метастазирал ТНКМЖ, провеждали или не адювантна ХТ и група неметастазирани болни**

Хистологичен вид	1 гр.	2 гр.	3 гр.	4 гр.	Група не-метастазирани
Инвазивен дуктален	70, 0%	71, 1%	36, 8%	50, 0%	74, 2%
Инвазивен лобуларен	20, 0%	21, 1%	21, 1%	5, 0%	3, 2%
Дукто-лобуларен	10, 0%	2, 6%	31, 6%	15, 5%	9, 7%
Други	0%	5, 3%	10, 5%	30, 0%	12, 9%

Липсва специфично разпределение между отделните хистологични видове при болните с ТНКМЖ.

С оглед проведената еднотипна адювантна химиотерапия при болните от 1 и 2 група се извърши анализ на честотата на хистологичните видове при обединението на тези две групи.

**Табл. 8. Честота на хистологичните видове при болни с метастазирал ТНКМЖ, провеждали или не адювантна ХТ и група неметастазирани болни, при обединение на 1 и 2 група:**

Хистологичен вид	1гр. + 2гр.	3 гр.	4гр.	Група не-метастазирани
Инвазивен дуктален	70, 0%	36, 8%	50, 0%	74, 2%
Инвазивен лобуларен	20, 7%	21, 1%	5, 0%	3, 2%
Дукто-лобуларен	5, 2%	31, 6%	15, 0%	9, 7%
други	3, 4%	10, 5%	30, 0%	12, 9%

Не се установява разлика при обединяването на двете групи по отношение на честотата на хистологичния вид.

Установява се статистически значима връзка между хистологичния вид и съответната група болни ( $p=0,003$ ). При пациентките, провеждали адювантна химиотерапия, преобладава инвазивният дуктален и лобуларен карцином, а при тези, които не са провеждали адювантна химиотерапия, преобладават типове, различни от тях.

Сред болните, провели адювантна химиотерапия, честотата в полза на инвазивния дуктален карцином се повишава на 70,0%. Висока е честотата на този хистологичен вид и при неметастазиралите болни - 74,2%, докато другите подтипове се срещат по-рядко: от 3, 2% до 12, 9%.

Нашите изводи сочат, че при жените, провеждали адювантна химиотерапия, преобладаващият хистологичен вид е инвазивният дуктален карцином, следван от лобуларния, докато при по-малко рискови болни, т.е. когато не се налага провеждане на адювантна химиотерапия, преобладаващите хистологични типове са други. В тази връзка е и изводът, че хистологичният тип е един от определящите фактори за назначаване на адювантна химиотерапия.



В подкрепа на тези данни е и анализът на Reis-Fiho J., et all. 2008, потвърждаващ този факт. В това проучване се посочва, че наличието на други хистологични типове - медуларен, анапластичен, аденоидно - кистичен варира от 40-100% при ТНКМЖ, т. е. редките хистологични типове също биха могли да имат негативен рецепторен статус. Това налага повишено внимание при определяне на хистологията на тумора, поради различията в клиничното протичане на заболяването.

В анализа на болните от Онкологичния институт в Любляна с инвазивен дуктален карцином са 90,7%, което е една много висока честота на този хистологичен вид при ТНКМЖ.

### 3) Размер на тумора

Обобщените данни от проследените болни показват, че средният размер на тумора е 2, 11 см (+/- 1, 039). Между отделните групи не се установява статистическа значимост ( $p > 0, 05$ ). При добавяне в анализа на групата с неметастазирани болни средният размер на тумора не се променя – 2. 188 см (+/-1, 0279). Резултатите не са статистически значими ( $p = 0, 062$ ).

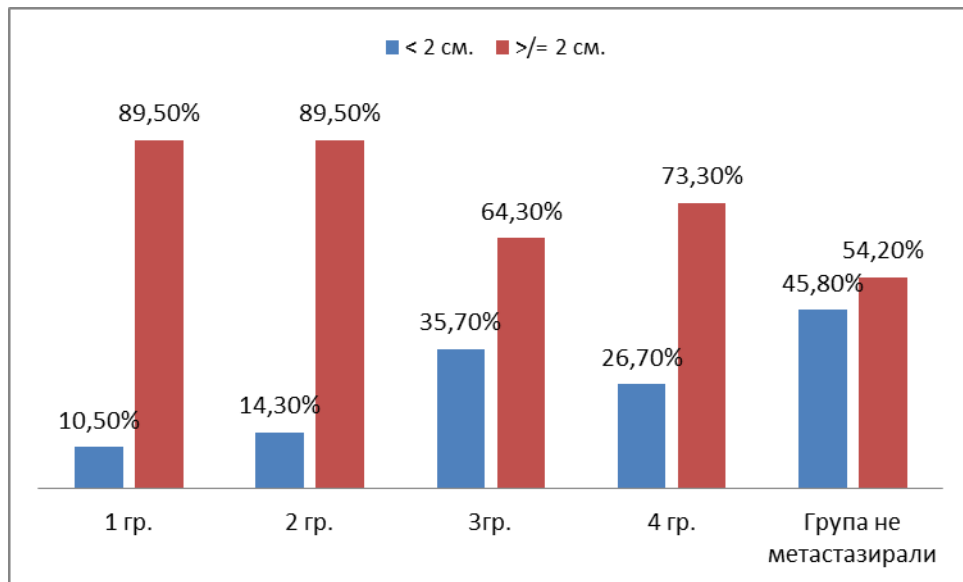
С оглед на по-точното определяне прогностичната стойност на показателя размер на тумора болните бяха разделени на две групи: първа група - тумори с размер по-малък от 2 см; втора - с размер равен или по-голям от 2 см.

Проследените болни с размер под 2 см са 26 (25, 7%), а с равен или по-голям от 2 см - 75 болни (74, 3%).

**Табл. 9. Разпределение по размер на тумора в групите болни с ТНКМЖ**

Размер на тумора	1 гр.	2 гр.	3гр.	4 гр.	Група не-метастазирани
< 2 см.	10, 5%	14, 3%	35, 7%	26, 7%	45, 8%
>/= 2 см.	89, 5%	89, 5%	64, 3%	73, 3%	54, 2%

**Фиг. 5. Разпределение по размер на тумора в групите болни с ТНКМЖ**

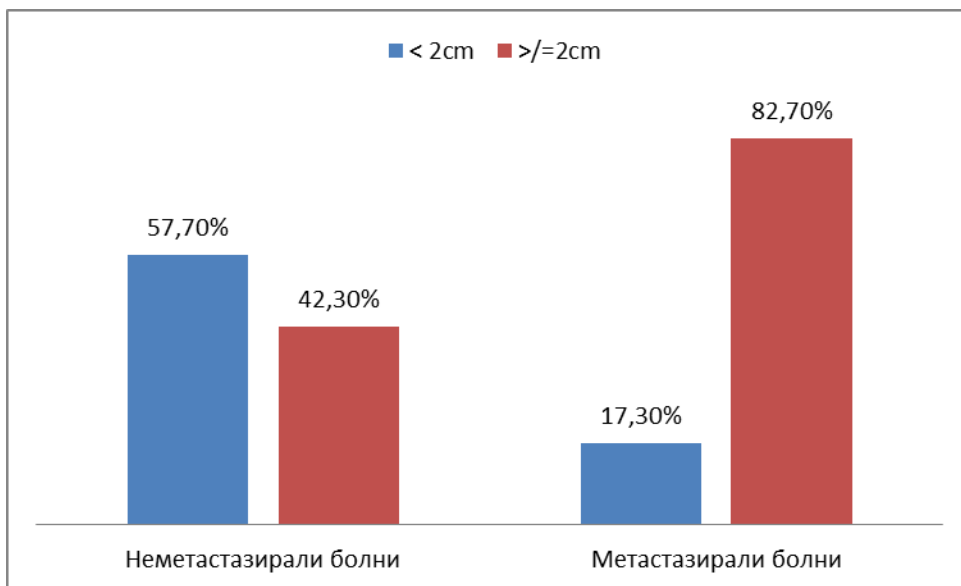


**Табл. 10. Разпределение по размер на тумора при обединяване на 1 и 2 група болни**

Размер на тумора	1 гр. +2 гр.	3 гр.	4 гр.	Група не метастазирани
< 2 см.	12, 8%	35, 7%	26, 7%	45, 8%
>/= 2 см.	87, 2%	64, 3%	73, 3%	54, 2%

За да се установи дали размерът на тумора може да бъде прогностичен фактор, болните се разделят на две групи - неметастазирани (30 болни - 23, 7%) и с метастази (100 болни - 76, 3%).

**Фиг. 6. Разпределение на метастазиралите и неметастазиралите болни според размера на тумора**



Статистически значима е зависимостта между двете групи болни по размер на тумора ( $p=0,016$ ). Изразява се в това, че в групата на неметастазиралите болни размерът на тумора е по-малък от 2 см, процентът на метастазиране е 57,7%, а в групата с тумор, по-голям или равен на 2 см, процентът на метастазиралите е 82,7%. Следователно болните с тумор по-голям или равен на 2 см имат значително по-висока честота на метастазиране.

Прогностичният маркер „размер на тумора“, правилно определен при оперативната интервенция на млечната жлеза, е свързан с прецизно стадиране на заболяването. Потвърждение на нашите изводи намираме в проучването на Тапја О., et. all. 2011, където болните с ТНКМЖ и тумор над 2 см са 59%.

Вероятно тази честота е по-ниска, тъй като анализът обхваща всички болни с ТНКМЖ, без да се разделят на метастазирани и неметастазирани. Зависимостта между размера на тумора и СЗП се установява и в анализа на 377 болни от Parker J., et all. 2009 . Констатира се, че жени с ТНКМЖ и тумор, равен и по-малък от 1 см, имат по-добра петгодишна СЗП, отколкото болни с по-голям тумор.

Значението на големината на тумора за прогнозата на заболяването се потвърждава и от проследените 3758 болни от Petar K., et all. 2010 в Раковия център

в Есен, Германия. След проведена неoadювантна терапия на посочения брой жени 506 имат остатъчен тумор. Установява се, че малкият размер корелира с удължаване на общата преживяемост (ОП).

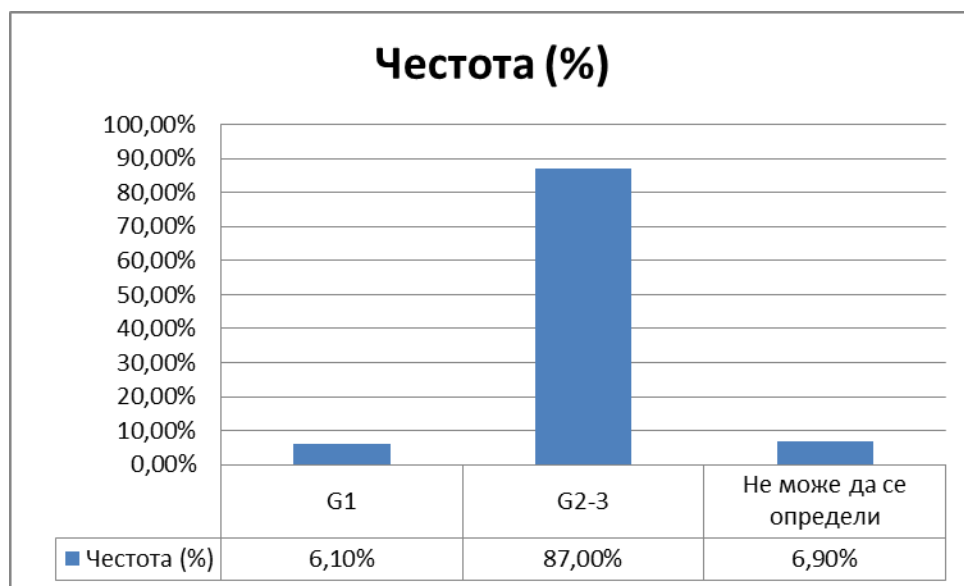
Подобно е заключението и в анализа на Kurian A., et all. 2010 при 554 жени с ТНКМЖ. Установява се, че при тумори, по-малки от 1 см и негативни лимфни възли, свободната от рецидиви преживяемост и ОП са по-добри при наличие на статистическа значимост ( $p=0,002$ ).

Утвърдените препоръки от St. Gallen за прогностичното значение на размера на тумора при карцинома на млечната жлеза са важни с оглед агресивната природа на ТНКМЖ. Насоките в проучванията са към отделно разглеждане на тумори с по-малки размери и оценка на този маркер в съчетание с други прогностични белези.

#### 4) Степен на малигненост

За показателя степен на малигненост (G) се установява, че честотата на G1 е 6,1% (8 болни); G2-3 - 87,0% (114 болни) и неопределен G при 6,9% (9 болни). Разпределението е показано на фигура 7.

**Фиг. 7. Разпределение на болните с ТНКМЖ по степен на малигненост**



Болните са сравнени по степен на малигненост и между отделните групи. В анализа участват и болните с неметастазирало заболяване.

**Таблица 11. Разпределение по степен на малигненост в групите болни с ТНКМЖ**

Грейдинг	1гр.	2гр.	3гр.	4гр.	Не-метастазирали
G1	5, 0%	9, 1%	16, 7%	5, 6%	0,4
G 2-3	85, 0%	72, 7%	77, 8%	77, 8%	77, 4%
Не може да се определи	10, 0%	18, 2%	5, 6%	16, 7%	22, 6%

Извършено е и сравняване на честотата на показателя степен на малигненост при метастазирали и неметастазирали болни.

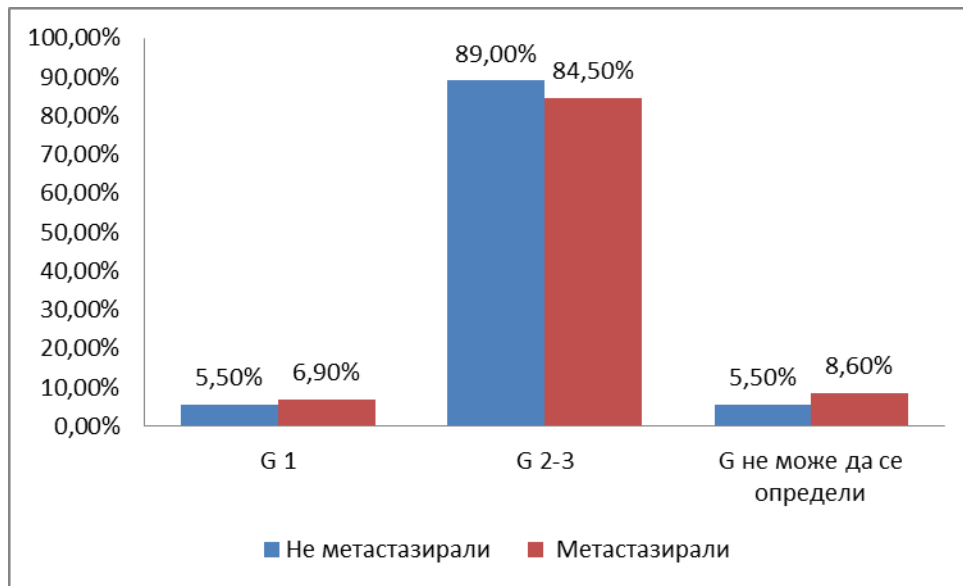
**Табл. 12. Сравняване честотата на степента на малигненост при метастазирал и неметастазирали болни**

Грейдинг	Метастазирали	Неметастазирали
G1	0,1%	8, 8%
G2-3	77, 3%	78, 0%
Не може да се определи	22, 6%	13, 2%

Не се установява статистически значима зависимост между двете обединени групи и степента на малигненост G ( $p = 0, 121$ ).

При анализа на болните със и без метастази се установява, че преобладават умерено към ниско диференцираните типове: 130 болни, от които 114 са с G2-3 (87, 7%); 8 болни с G1 (6, 1%); 9 болни с неопределен G ( 6, 9%).

**Фиг. 8. Честота на степента на малигненост при метастазирани и неметастазирани болни с ТНКМЖ**



При болните по-честа е умерената към ниска степен на малигненост в значителен процент. Не се установява статистически значима зависимост между болните със или без метастази и степента на малигненост ( $p=0,054$ ). Стойността на  $p$  е близка до критичната стойност ( $0,05$ ). Това означава, че при друг обем на извадката изводът може да се промени.

Нашите данни съответстват на общоприетата характеристика на ТНКМЖ. Тя отново е в непосредствена връзка с неблагоприятния ход на протичане на заболяването. Ниската диференциация на тумора корелира и с доминиращия базален тип при ТНКМЖ, макар и да няма пълно припокриване.

Basal-like типа притежава няколко характерни хистологични отличителни черти - експресия на базални цитокератини, лимфоваскуларна инфилтрация, висока митотична активност, ниска диференциация на тумора. Утвърдено е становището, че няма пълна идентичност на Basal-like типа и ТНКМЖ – приблизително е в 75% от туморите.

В проведеня анализ не беше възможно да се разграничат тези типове, имайки предвид данните само за хистологичната диагноза и липса на имунохистохимично изследване в преобладаващата част от болните. Степента на диференциация, освен че е важен прогностичен маркер, би могла да ни насочи и към типа ТНКМЖ. От това следва, че в настоящите и бъдещи разработки имунохистохимичният профил е особено наложителен.

Необходимо е да се отбележи, че в патологоанатомичния доклад на нашите болни не са отразени някои характерни особености на туморната биология: митотичен индекс, централни некрози, лимфоваскуларна инфилтрация. Липсата на тези данни определено е недостатък на представената хистологична диагноза не само при ТНКМЖ, но и при всички останали тумори на гърдата.

5) Лимфни възли. Проследен е общият брой лимфни възли, изследвани при оперативното лечение, както и броят на метастазиралите лимфни възли.

Средният брой изследвани лимфни възли е 10, 34 (+/-3, 734). Минималният брой изследвани при оперативното лечение лимфни възли е 1, а максималният е 26.

**Табл. 13. Честота на изследваните и метастазирали лимфни възли**

<b>Лимфни възли</b>	<b>1-група</b>	<b>2-група</b>	<b>3-група</b>	<b>4-група</b>
Брой изследвани лимфни възли	10, 78	10, 15	11, 0	9, 38
Ст. отклонение	+/- 3, 541	+/- 4, 505	+/- 2, 944	+/-3, 5
Брой метастазирали лимфни възли	2, 24	3, 03	3, 32	, 29
Ст. отклонение	+/-4, 116	+/- 3, 487	+/- 3, 560	+/-, 772

От анализа следва, че не съществува статистически значимо различие между групите болни по отношение на броя изследвани лимфни възли ( $p=0,181$ ). Според настоящите стандарти за поведение при карцинома на млечната жлеза един от определящите прогностични и рискови фактори е броят ангажирани от метастази лимфни възли. На първо място обаче е броят на дисецираните лимфни възли. При нашите болни средният брой изследвани лимфни възли е 10 ( $\pm 3,734$ ), при минимален брой - 1 и максимален брой 26 лимфни възли.

Според въведените стандарти на NCCN, ESMO необходимият минимален брой изследвани лимфни възли при оперативното лечение е  $\geq 10$  за стадиране на аксилата. Според броя на засегнатите лимфни възли се определя и видът адювантна химиотерапия, което е в непосредствена връзка с правилното стадиране.

*Обобщение: Метастазираният тройно негативен карцином на млечната жлеза възниква най-често в пери- и менопаузалната възраст при жените; размер на тумора около 2 см определя по-нисък риск от метастазирание, докато при увеличаване на размера на тумора се повишава значително честотата на метастазирание; преобладава нискодиференцираният инвазивен дуктален карцином.*

**Задача №2:** *Оценка на връзката между някои прогностични белези и появата на метастази при ТНКМЖ с цел подобряване стратегията за комплексно лечение при туморите на млечната жлеза.*

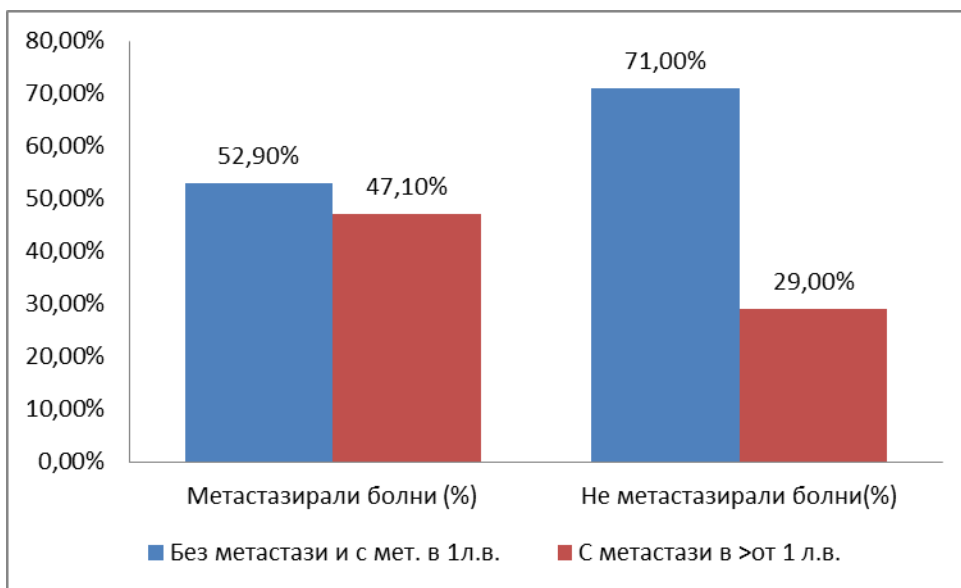
Средният брой засегнати от метастази лимфни възли в нашето проучване е 2,39 ( $\pm 3,433$ ). Установява се, че има поне една двойка групи, различаващи се по брой засегнати лимфни възли ( $p < 0,0001$ ). Според пост-хок теста има разлика между групите 2 и 4, както и между 3 и 4 ( $p < 0,0001$ ).

В анализа 57,6% от болните са с 1 метастазирал лимфен възел, 42,4% са с повече от 1 метастазирал лимфен възел. Групата неметастазирани болни имат един лимфен възел или са без ангажиране на лимфни възли в 71,0% и в 29,0% са с повече от 1 лимфен възел. При групата с метастазирало заболяване болните с 1



метастатичен лимфен възел са 52, 9%; 47, 1% са с повече от 1 засегнат лимфен възел.

**Фиг. 9. Разпределение на засегнатите лимфни възли при метастазирани и неметастазирани болни**

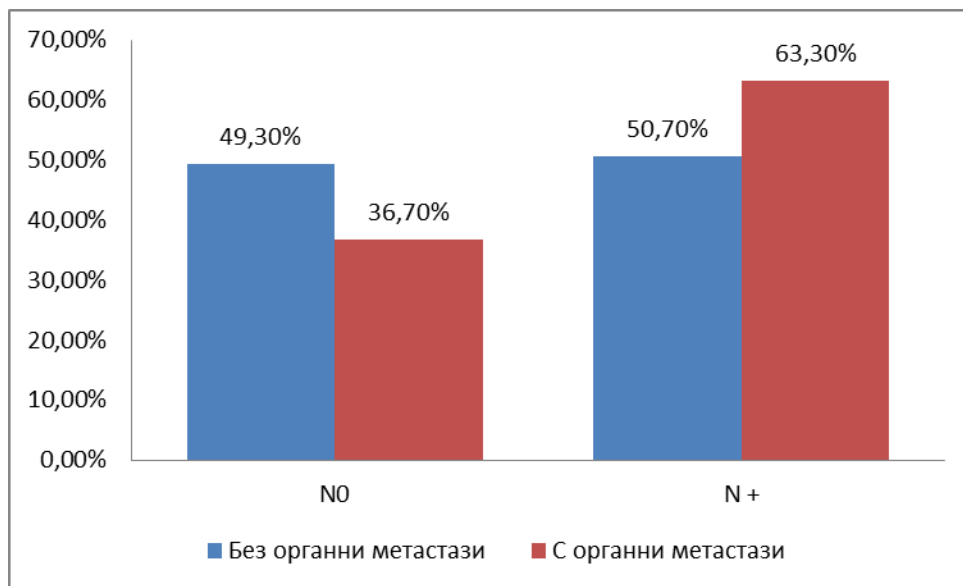


В заключение болните с неметастазирало заболяване имат 26, 3% засегнати лимфни възли, а групата с метастазирало заболяване е със 73, 7% ангажирани лимфни възли. Независимо че статистическата зависимост е  $p=0,093$ , налице е тенденция за по-висок риск от метастазирание на заболяването при позитивни лимфни възли.

Връзката между органното метастазирание и засегнатите лимфни възли показва следното: болни без ангажиране на лимфните възли (49, 3%) са без органно метастазирание и 36, 7% са с органно метастазирание; болните с 1 или повече положителни лимфни възли без органно метастазирание - 50,7% и с органно метастазирание - 63, 3%, т. е тези, които имат засягане на 1 или повече лимфни

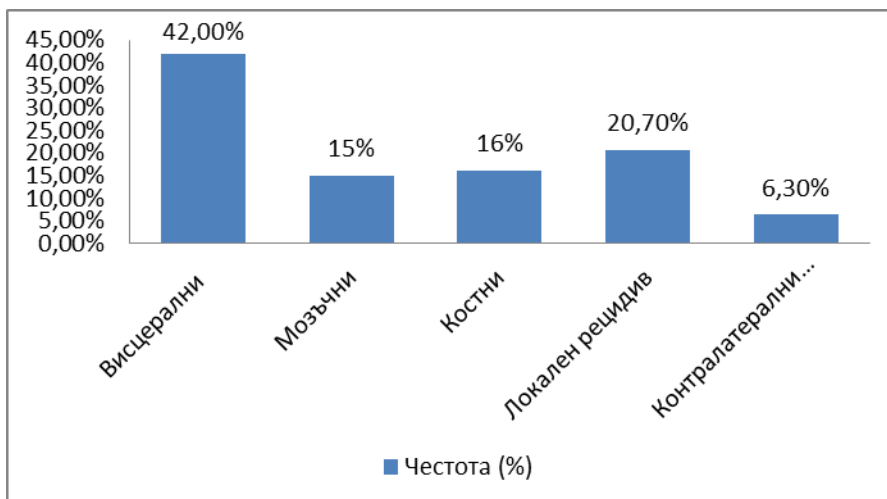
възли имат по-висок риск от органно метастазиране, макар и да не се установява статистическа значимост ( $p=0,193$ ).

**Фиг. 10. Висцерални метастази в зависимост от статуса на аксиларните лимфни възли**



Анализирайки общо 130 болни (метастазирани и неметастазирани) се установява, че 55,7% са без метастази, 42,0% са с органни метастази, 0,8% са с костни, 1,5% са с метастази в другата млечна жлеза или локални рецидиви.

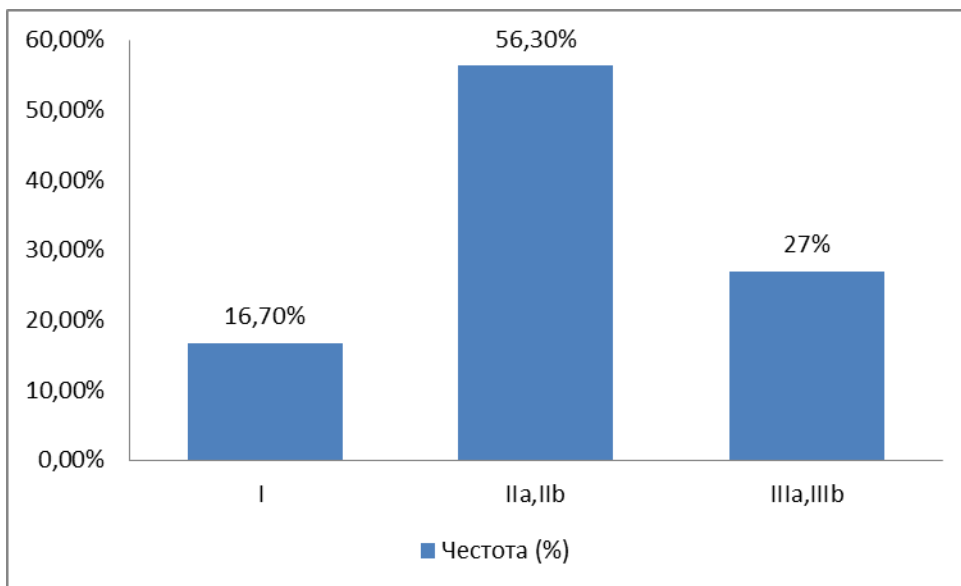
**Фиг. 11. Честота на локалните рецидиви и далечно метастазиране при ТНКМЖ**



Разглеждайки честотата само при метастазиралите болни (общ брой 100) в отделните групи се оказва следното: 42% от всички болни са с органни метастази, 15% - с мозъчни метастази, 20, 7% с локални рецидиви, в 16% са ангажирани костите; 6, 3% са метастазите в другата млечна жлеза.

Разглеждайки честотата само на органното метастазиране, се установява следното: болните с размер на тумора < от 2 см без органни метастази са 65, 4%, докато с тумор  $\geq$  2 см са 52, 0%; болните с < 2 см тумор с органни метастази са 34, 6%, а с тумор  $\geq$  на 2 см. с органни метастази са 48, 0%. Има тенденция към органно метастазиране и при по-малките от 2 см тумори, но разликата не е статистически значима ( $p=0, 261$ ).

**Фиг. 12. Разпределение на болните с ТНКМЖ по стадии**



При анализа е установено, че повече от половината от включените болни с ТНКМЖ са във втори стадий (T0-3 N0-1 M0), следвани от трети стадий (T0-3 N2 M0), и първи стадий (T0-1 N0 M0) .

В анализа броят на метастазиралите лимфни възли средно е 2, 39 (+/-3, 433). От това може да се направи изводът, че болните в нашата група са в граничен стадий по отношение на лимфните възли - N1-N2. Пациентките се разделиха на такива с липса на метастази и на болни с наличие на метастази в 1 или повече лимфни възли. Направи се оценяване на органното метастазирание и се установи, че дори и при 1 засегнат лимфен възел рискът за метастазирание на заболяването е по-голям с 63, 3% .

Правилното стадиране на заболяването, включвайки и достатъчен брой изследвани лимфни възли, се налага от агресивната природа на ТНКМЖ.

Leonel F., et all. 2011г. проследяват 1711 пациентки с ТНКМЖ, категоризирайки размера на тумора, хистологичния грейдинг и броя метастазирани лимфни възли. Тези прогностични фактори се сравняват с общата преживяемост (ОП) и преживяемостта без рецидиви (ПБР). Установява се, че 45% от жените с ТНКМЖ имат 1-3 позитивни лимфни възли, 25% са с 4-9, 30% са с >10, N3 (p<0,

0001). Петгодишната ПБР е съответно 67% за N0, 52% за N1, 36% и 33% за N3 ( $p < 0,0001$ ).

Много по-убедителни са данните за прогностичната стойност на размера на тумора и броя засегнати лимфни възли, когато не се анализира само групата на ТНКМЖ, а тя се сравнява с болни с не-ТНКМЖ. В потвърждение на това е голямото проучване на Che Lin S., et al. 2012 при 1048 тайвански жени. От тях 15, 9% са с ТНКМЖ. Основните разгледани прогностични фактори са възраст, размер на тумора, брой метастазирани лимфни възли. Отчита се 5-годишната преживяемост без прогресия. Оказва се, че тя е по-ниска при болните с ТНКМЖ ( $p = 0,0026$ ), отколкото при болните с не-ТНКМЖ. Сравнението на болни с позитивни лимфни възли и такива с негативни показва, че СЗП при ТНКМЖ с позитивни лимфни възли е по-лоша от тази при болни с не-ТНКМЖ. Констатирана е най-продължителна СЗП при ER-позитивни и HER2-негативни болни, с позитивни или негативни прогестеронови рецептори ( $p < 0,0001$ ). От цялата група болни най-ниска СЗП има при ТНКМЖ с позитивни лимфни възли независимо от техния брой.

Проучването на Liedke S., et al. 2008 също посочва високия процент на ангажиране на лимфните възли при диагностиката на ТНКМЖ - 46, 1%. Този анализ подчертава връзката между наличие на метастатични лимфни възли и общата преживяемост (ОП) и го разглежда като самостоятелен прогностичен фактор. Съобщава се, че при наличие на метастазирани лимфни възли рискът от рецидив е 2,71 пъти по-висок, рискът от смърт - 2,96 пъти по-висок ( $p < 0,0001$ ) в сравнение с пациенти без лимфни метастази. Този факт не е потвърден в други клинични изпитвания, напр. на Leonel F., et al., 2011 .

Важен елемент в този анализ е и маркирането на лимфоваскуларната инвазия, установена в 1/3 от болните. Нейното наличие е прогностичен фактор, доказан и в други клинични изпитвания. В нашето проучване не е анализиран прогностичният фактор лимфоваскуларна инвазия поради липса на изследване или описание в болничната документация. Това може да се отчете като слабост с оглед поставяне на по-пълна и точна диагноза, както и за определяне прогнозата на болните.

Сравнявайки честотата на органното метастазиране при нашите болни се установява, че има тенденция към висцерална дисеминация дори и при по-малки от 2 см тумори, макар и това да не е статистически значимо ( $p = 0,261$ ). Оказва се, че честотата на органното метастазиране се измества към по-нисък стадий на заболяването.

Изследване честотата на органното метастазиране и предилекцията към определен орган е важно и пряко свързано с целенасоченото проследяване на болните. В анализа на Che-Lin S., et al. 2012 при 1800 китайски жени с ТНКМЖ се констатира, че преобладават висцералните метастази ( $HR=2,69$ ,  $p<0,001$ ); от тях най-чести са чернодробни ( $HR=1,7$ ,  $p=0,003$ ) и мозъчни ( $HR=1,8$ ,  $p=0,003$ ). Установява се с 2,69 пъти по-висока честота на висцералните метастази при ТНКМЖ, 1,8 пъти по-висока честота на мозъчните, сравнени с тези при не-ТНКМЖ. По отношение на костните метастази честотата е по-ниска, макар едно от проучванията да не намира разлика в нея между ТНКМЖ и не-ТНКМЖ ( Alegria A., et al. 2011 ) .

Потвърждение за високия процент на органно метастазиране ни дава и анализът на Lidke S., et al. 2008. Подчертава се, че органното метастазиране преобладава при ТНКМЖ - 2143 болни от проследени 12 858 болни с карцином на млечната жлеза. Висцералните органи са ангажирани в 70,4%. Засегнати са на първо място бял дроб, мозък, по-малко кости. Жените с костни метастази са само 13% при ТНКМЖ, сравнен с не-ТНКМЖ - 74% ( $p=0,027$ ).

В нашето проучване не е детайлизирана органната локализация на метастазите поради малкия брой на проследените болни. Факт е, че почти половината от тях са с метастази в паренхимни органи . Костното ангажиране в нашия анализ е с малко по-висок процент в сравнение с данните от посочените клинични проучвания.

При ТНКМЖ с оглед високата честота на мозъчните метастази, проявяващи се в много случаи скоро след началото на заболяването, се налага по-стриктно проследяване на болните. В този смисъл диагностиката би могла да се задълбочи в насока на провеждане изследвания на главен мозък, дори и при дискретна мозъчна

симптоматика. Въвеждането на нови, по-малко инвазивни методи за лечение на мозъчните метастази би подобрило качеството на живот на болните, като се има предвид, че преживяемостта след диагнозата на мозъчните метастази е 3-5 месеца, сравнена със 7-12 при болните с не-ТНКМЖ.

В нашия анализ не са разгледани в отделни групи болните с локални рецидиви поради броя проследени болни.

Наблюдаването на пациентките с ТНКМЖ за локални рецидиви се налага от високата им честота през първите 3 години след поставяне на диагнозата, след което тя рязко спада. Тези данни са потвърдени както от проучването на Lidke S., et al. 2008, така и от други изследователи. Доказва се, че честотата на рецидивите е по-висока отново в рамките на първите 3-5 години.

Изводите на редица изследователи потвърждават, че рецидивите са по-чести в първите 3 години и намаляват след това. Следователно жени, при които не се установява рецидив в първите 5 години от диагнозата, шансът да загинат от него, е по-малък. Честотата на локалните рецидиви в това проучване е 7,1%, на висцералните метастази - 67,1%. Тези данни са свързани с предполагаемото преобладаващо хематогенно метастазирание на ТНКМЖ.

#### *Обобщение:*

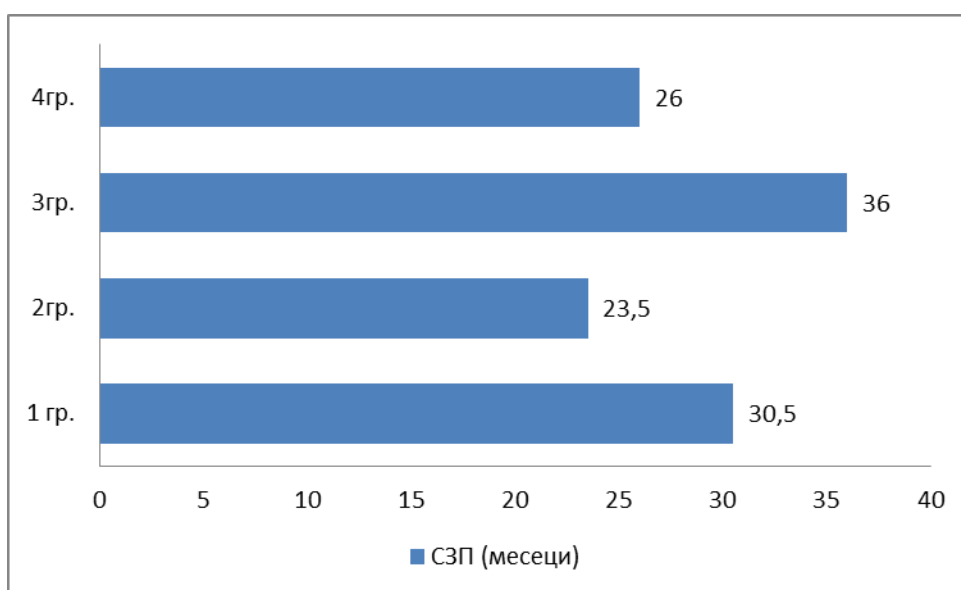
*Наличието дори и на един метастазирал лимфен възел при ТНКМЖ повишава риска от метастазирание на заболяването. При позитивен лимфен възел се повишава и честотата на органното метастазирание, което е свързано с по-лоша прогноза. Само органното метастазирание няма отношение към размера на тумора, но има връзка с метастазирането въобще, независимо от придилекционния орган.*

**Задача № 3:** *Определяне на свободния от заболяване интервал при пациентки, на които е приложено адювантно лечение с антрациклин-таксан съдържаща химиотерапия, сравнен с интервала при болни, получили само антрациклин или с група болни, непровеждали адювантна терапия с цел оптимизиране на адювантното лечение при болни с ТНКМЖ.*

При четирите групи болни е проследена свободната от заболяване преживяемост (СЗП) с оглед сравняване на ефекта от проведеното адювантно лечение. Съпоставя се и резултатът от липсата или наличие на адювантна химиотерапия. Проследеният интервал е отчетен в месеци.

От разгледаните 100 болни с метастазирало заболяване 60, 2 % са получили адювантна химиотерапия с антрациклини, 19, 4% - адювантна терапия с комбинация на антрациклини и таксан и 20, 4% не са получавали никаква химиотерапия.

**Фиг. 13. Свободна от заболяване преживяемост (СЗП) в четирите групи болни**



В групата, провела адювантна химиотерапия с комбиниран режим, съдържащ антрациклин и таксан, свободният от заболяване интервал е най-продължителен - 36 месеца, следван от първа и втора група (и двете имат проведена адювантна химиотерапия само с антрациклини) между 30 и 23 месеца и най-малък е този период при групата, не провеждала никаква адювантна химиотерапия - 26 месеца.



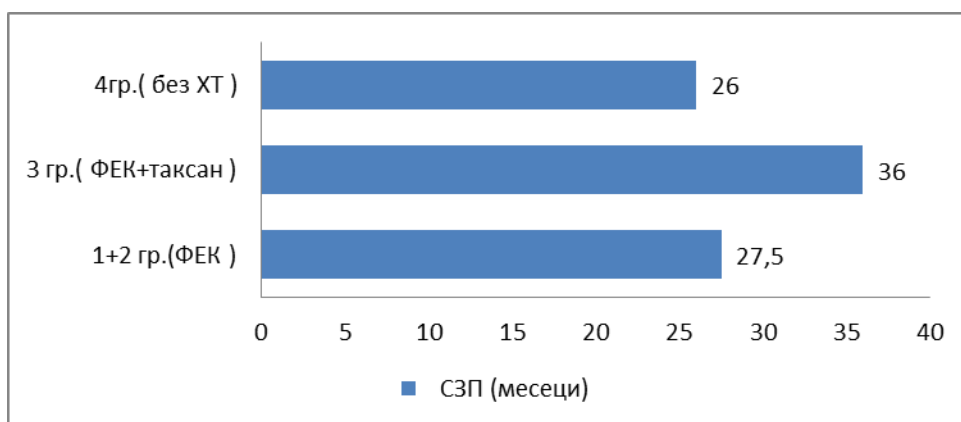
Набелязана е тенденция за увеличаване на свободния от заболяване интервал в групата, провеждала адювантна терапия с антрациклин - таксан, но не се установява статистически значимо различие ( $p=0,943$ ).

При анализа, обединяващ двете групи, провели адювантна химиотерапия с антрациклини ( 1+2 ) група, сравнени с 3 група, провели адювантна химиотерапия с комбиниран режим антрациклин + таксан и 4 група - без адювантна химиотерапия, резултатите се запазват в същата статистическа зависимост. Най-голяма свободна от заболяване преживяемост е наблюдавана при 3-та група – антрациклин+таксан - 36 месеца, следвана от групата с антрациклини - 27,5 месеца и най-кратък - в групата, не провеждала адювантна химиотерапия - 26,0 месеца.

**Табл. 14. СЗП след адювантна ХТ в групите болни при обединение на 1 и 2 група**

Групи	СЗП (месеци)	Ст. отклонение
1+2 гр. (ФЕК )	27, 5	+/- 26, 6
3 гр. ( ФЕК+таксан )	36, 0	+/- 16, 1
4гр. ( без ХТ )	26, 0	+/- 23, 6

**Фиг. 14. СЗП след адювантна ХТ в групите болни при обединение на 1 и 2 група**



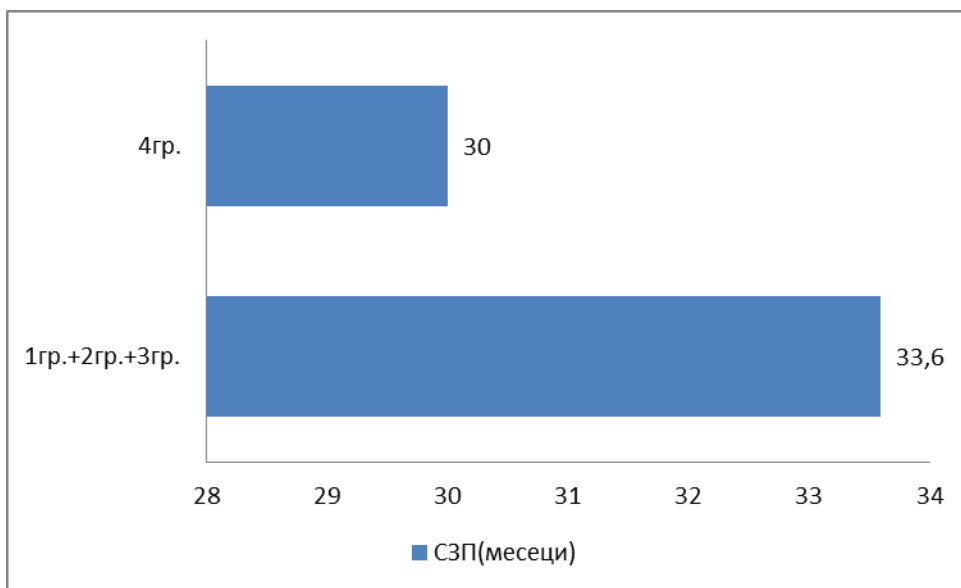
Резултатите се потвърждават и при обединяване на 1+2 група (СЗП - 27, 5), 3+4 група ( СЗП - 30, 0) месеца – налице е удължаване на свободния от заболяване

интервал от провеждането на комбинирана адювантна химиотерапия с антрациклини + таксани в сравнение с болните, провеждали лечение само с антрациклини или тези без адювантна химиотерапия.

Средната свободна от заболяване преживяемост при всички болни е 32,76 (+/-24,083).

За установяване на съществуваща разлика в свободната от заболяване преживяемост (СЗП) при болни, провеждали адювантна химиотерапия и тези, които не са провеждали, се сравняват групи 1+2+3 и 4 група. Установява се, че болните с химиотерапия имат по-продължителна СЗП - 33,6 месеца, а тези без химиотерапия - 30,0 месеца.

**Фиг. 15. СЗП при болни с ТНКМЖ, провеждали и непровеждали адювантна ХТ**



Тези данни съответстват на препоръките на ESMO и NCCN за необходимостта от провеждане на адювантна химиотерапия при болни с позитивни лимфни възли и високо рискови болни с негативни лимфни възли.

Прогнозата на ТНКМЖ се определя и от вида на провежданата адювантна терапия и тази за метастазирало заболяване.

В нашето проучване се сравнява ефектът от проведената адювантна химиотерапия с комбинация на антрациклин и таксан с група болни само на терапия с антрациклини и група болни, непровеждали никаква химиотерапия. Отбелязаният минимален период на свободната от заболяване преживяемост е 4 месеца, максималният - 101 месеца. Най-висока е СЗП при провеждане на комбинирана терапия с антрациклини и таксани - 36 месеца, като най-ниска е в групата, непровеждала адювантна химиотерапия. Групата само с антрациклини е с междинен резултат - 27,5 месеца (+/-26, 6). Тези резултати не достигат статистическа значимост ( $p=0,943$ ).

Тези данни корелират с изнесените до момента резултати от няколко клинични проучвания, отчитащи ефекта от приложението на адювантната терапия с антрациклини, както и на комбинацията им с таксани.

Фаза II и III клинично изпитване на Lepote S., et al. 2009 посочва високата ефективност на антрациклинов режим, сравнен с CMF при ТНКМЖ. Наблюдава се редуциране на риска от рецидиви с 23% ( $p=.11$ ).

В клинично проучване PACS-01 се сравнява приложението на 6 цикъла FEC с 3 цикъла FEC + 3 цикъла Docetaxel. При 8-годишното проследяване се констатира, че групата болни с комбинирана терапия има с 4 % по-висока СЗП, както и с 5 % по-добра обща преживяемост.

В същата светлина са и изводите, направени в BCIRG 005 - клинично проучване на Breast Cancer International Research Group, където е сравнен ефекта на 4 цикъла AC, последвани от 4 цикъла Docetaxel с 6 цикъла docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamid (TAC).

The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-30 (NSABP) сравнява ползите от приложението на 4 цикъла AC + 4 цикъла Docetaxel с 4 цикъла AC и 4 цикъла TAC. В BCIRG 005 няма разлика в двете рамена по отношение на

СЗП и ОП. Резултатите от NSABP-B-30 за тези два показателя са в подкрепа на приложението на антрациклинова терапия, продължена с Docetaxel.

Акцентът на тези проучвания е насочен освен към потвърждаване на ефекта от адювантната терапия с антрациклини и таксани при ТНKMЖ, така и към отдиференциране на терапиите с достатъчна ефективност, но с по-малка токсичност. В клинично проучване BCIRG 005 фебрилната неутропения и инфекции степен 3-4 са по-високи при приложение на TAC ( $p < 0,0001$ ). В проучване NSABP B-30 най-висока е фебрилната неутропения - 22% при 4 AC+ 4T; 16% - TAC; 13% - AT ( $p < 0,0001$ ). Подобно е съотношението и при другите странични ефекти - инфекции, диария.

Отчитат се по-изразените токсични ефекти на комбинациите на антрациклини и таксани, сравнени с последователното им приложение. Адювантната химиотерапия с антрациклини и таксани при ТНKMЖ довежда до удължаване на свободната от заболяване преживяемост и общата преживяемост. Каква да бъде избраната за съответния пациент адювантна терапия, трябва да се съобрази със съществуващите рискови фактори, възрастта на болната, придружаващите заболявания и не на последно място – с предпочитанията на пациента.

Важен момент в адювантната химиотерапия на ТНKMЖ е необходимостта от добавяне на таксан към антрациклиновата комбинация. Проведените над 12 международни клинични изпитвания са в полза на по-високата ефективност от включването на таксани.

Изпитването GEICAM 9805 сочи, че TAC е по-ефективна от FAC. Необходимо е да се отбележи, че резултатите са при болни с висок риск и с негативни лимфни възли.

Проведеният анализ от Breast Cancer International Research Group на болни с ТНKMЖ и положителни лимфни възли показва, че в СЗП има незначителна разлика (74% срещу 60%) при приложение на TAC, сравнен с FEC ( $p = 0,051$ ).

В направения от нас анализ не са включени болни, провеждали само адювантна терапия с CMF.

Причината за това е малкият брой болни, получили този вид лечение. Известни са положителните резултати от няколко адювантни клинични изпитвания, потвърждаващи добрия ефект на тази комбинация. Такова проучване е MA-5. При него се сравнява класическата комбинация CMF с антрациклин - съдържаща терапия - CEF при пациентки в ранен стадий. Оказва се, че CMF показва по-добра 5-годишна преживяемост, но при жени с базален фенотип. Тези данни не се потвърждават от друго клинично изпитване - фаза III, където СЗП и обща преживяемост са значително по-добри при антрациклин-съдържащата химиотерапия.

*Обобщение: Свободната от заболяване преживяемост се увеличава при болните, провеждали адювантна химиотерапия. Наблюдава се тенденция за нарастването и при болни, провеждали комбинация на антрациклин и таксан в сравнение само с антрациклин-съдържаща химиотерапия.*

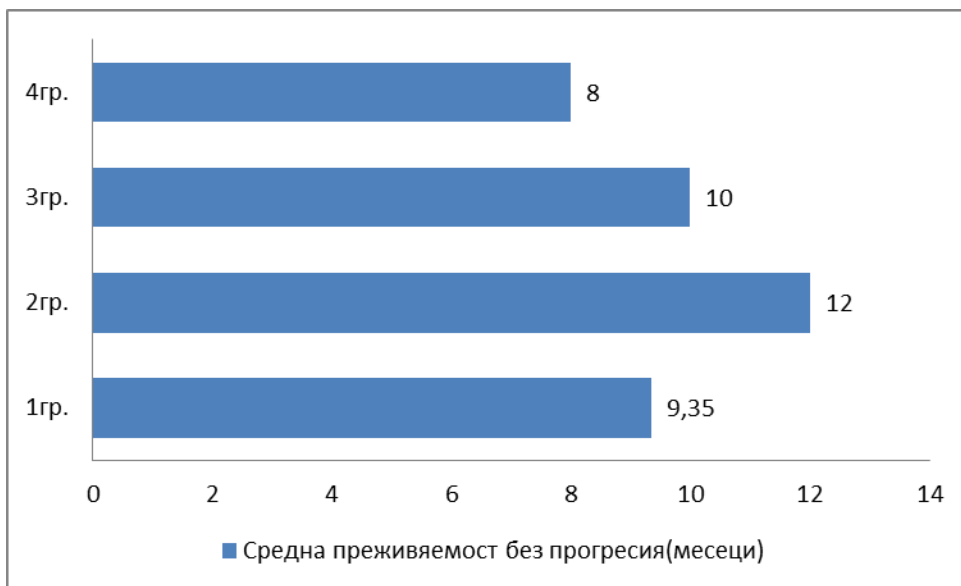
**Задача № 4:** *Определяне на средната преживяемост без прогресия при добавяне на Bevacizumab към таксан-съдържаща химиотерапия с оглед оценка на ефекта на прилаганата комбинация като първа линия лечение при метастазирало заболяване*

За отчитане на средната преживяемост без прогресия (ПБП) се извърши сравнение при различните групи болни. Те не се разграничават помежду си по вида терапия за метастазирало заболяване с изключение на 1 гр. болни. В тази група се провежда строго специфично лечение с комбинацията таксан + бевацизумаб.

**Таблица. 15. Преживяемост без прогресия след проведена първа линия ХТ**

Групи болни	Средна преживяемост без прогресия (месеци)	ст. откл.
1 гр.	9,35	0,621
2 гр.	12,0	2,243
3 гр.	10,0	5,0
4 гр.	8, 0	1,558

**Фиг. 16. Преживяемост без прогресия след проведена първа линия ХТ при отделните групи ТНКМЖ**



При болните от 2, 3 и 4 група не се прави разлика във вида проведена първа линия химиотерапия. За болните от 1 гр. видът химиотерапия за първа линия е фиксиран - таксан в комбинация с бевацизумаб. Лечението е до прогресия. Интервалът за всички болни варира от 2 до 57 месеца. Статистически значима разлика при отделните групи по отношение на преживяемост без прогресия според теста на Крускал - Уолис липсва ( $p=0,522$ ). Постигнатият интервал от 9,35 месеца в първата група е напълно задоволителен за лечение на метастазирал тройно негативен карцином на млечната жлеза. Трябва да се отбележи, че тази група болни са основно с органно метастазиране за разлика от останалите, което е свързано с по-лоша прогноза. Най-нисък е интервалът в групата, не провеждала никаква адювантна химиотерапия независимо от вида първа линия – 8,0 месеца. Набелязана е тенденция за по-дълга ПБП при болни, провеждали адювантна химиотерапия в сравнение с такива, които не са провеждали никаква адювантна терапия.

Лечението на метастазиращия ТНКМЖ е изключително трудно. До момента не е създаден алгоритъм за последователността на прилаганите цитостатици.

Навлизането на таргетната терапия в клиничната практика открива нови възможности въпреки многото неразрешени въпроси.

В нашето проучване една от групите получи първа линия химиотерапия – Paclitaxel, седмични вливания, към които бе добавен Bevasizumab.

Постигнатата средна преживяемост без прогресия съответства на данните от публикуваните няколко клинични изпитвания за приложението му при метастазирало заболяване.

Клинично проучване E2100, Katty M., et al., 2007, показва предимство на комбинираната терапия с таксан + Bevasizumab, сравнена с данните от монотерапията с таксан по отношение на СПП.

В клинично проучване MO19391, Pierga J., et al., 2008, комбинираният режим на таксан и Bevasizumab показва предимство пред други режими. Отбелязва се, че и в двете проучвания резултатите са по-добри при болните с ТНКМЖ, сравнени с другите типове рак на млечната жлеза.

Подобни са заключенията и от клинично проучване фаза III RIBBON-1, Robert NJ., et al., 2011, потвърждава подобряване на ефекта от лечението с капецитабин при добавяне на Bevasizumab като първа линия лечение на метастазирал карцином на млечната жлеза при HER2-негативни болни.

В RIBBON-2, Brufsky AM., et al., 2011, фаза III клинично изпитване, ПБП е 6,0 месеца при включване на бевацизумаб към втора линия химиотерапия, сравнена с рамото без него, където е 2,7 месеца ( $p=0,0006$ ).

*Обобщение: Болните, провеждали лечение за метастазирал ТНКМЖ като първа линия с комбинацията таксан + бевацизумаб имат задоволителна СЗП, съответстваща на резултатите от проведените до момента клинични изпитвания III фаза. Най-нисък е този интервал при непровеждали адювантна химиотерапия болни, т. е тези, които би трябвало да са с по-малко рискови фактори.*

**Задача № 5:** Изследване на имунохистохимични маркери характерни за болни с ТНKMЖ. Определяне на прогностичната им стойност с оглед избора на най-подходящ терапевтичен подход.

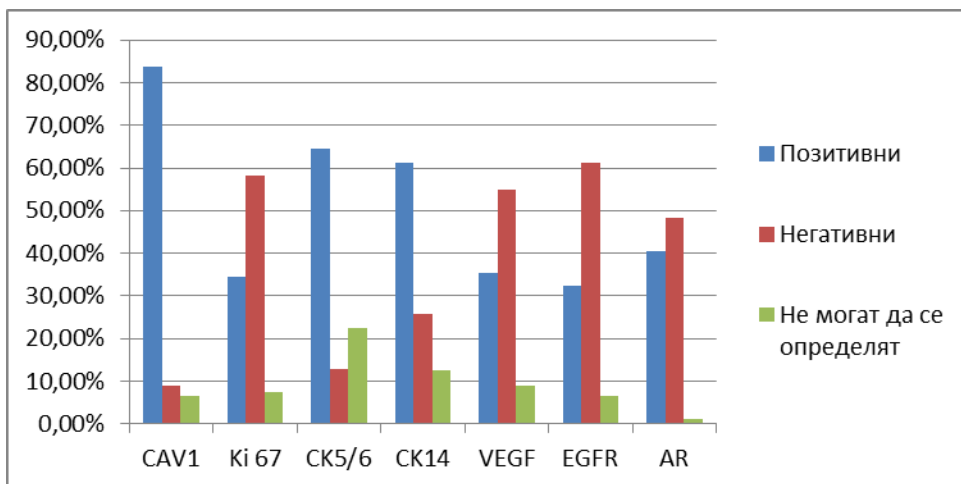
Анализирана е честотата на експресия на 7 молекулярни маркери при 64 болни с ТНKMЖ. Изборът на тези маркери се базира на данните от клинични проучвания, доказващи тяхната диагностична и прогностична стойност, както и чувствителност към определен вид лечение.

**Табл. 16. Честота на изследваните имунохистохимично 7 молекулярни маркери при метастазирал ТНKMЖ**

Молекулярни маркери	Позитивни	Негативни	Не могат да се определят
CAV1	83, 87%	9, 08%	6, 48%
Ki 67	34, 48%	58, 07%	7, 45%
CK5/6	64, 52%	12, 9%	22, 58%
CK14	61, 29%	25, 8%	12, 58%
VEGF	35, 48%	54, 84%	9, 08%
EGFR	32, 26%	61, 29%	6, 45%
AR	40, 6%	48, 4%	1%

**Фиг. 17. Честота на изследваните имунохистохимично 7 молекулярни маркери при метастазирал ТНKMЖ**

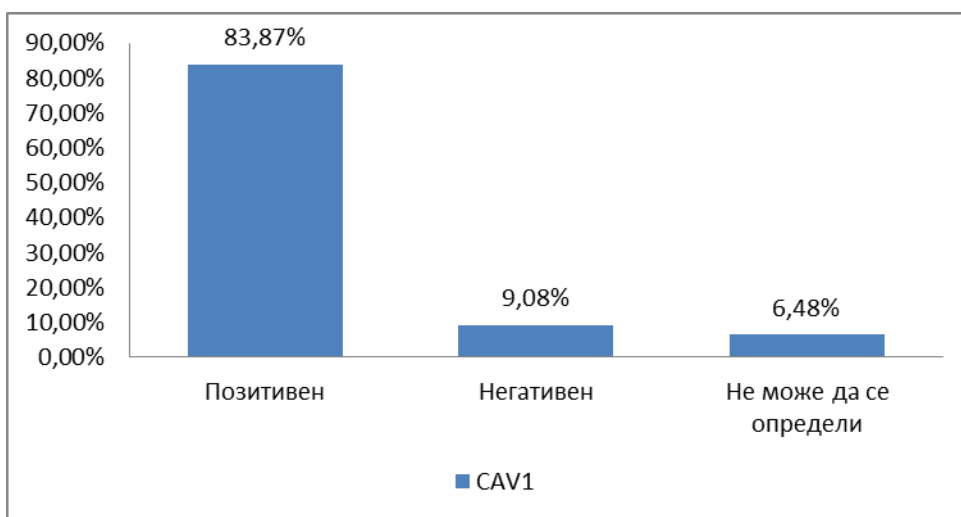




### 1) **CAVEOLIN1**

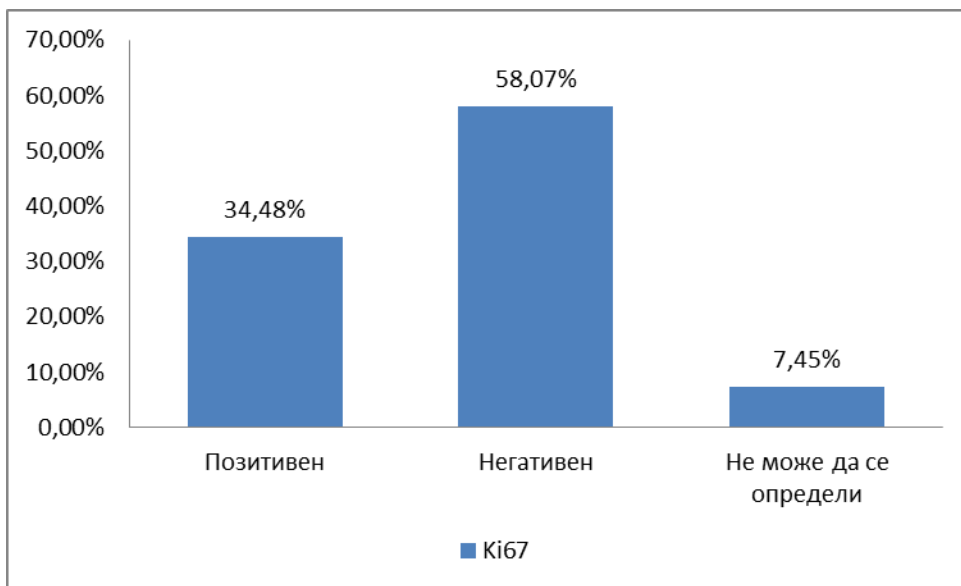
При имунохистохимично изследване на материал от болните с хистологично потвърден тройно негативен рак на млечната жлеза се установява, че caveolin1 се позитивира в значителен процент от изследваните болни - 83,9%; незначителен е дялът на болните с негативни стойности - 9,7%.

**Фиг. 18. Честота на експресия на CAV1 при болни с метастазирал ТНKMЖ**



### 2) **Ki-67**

**Фиг. 19. Честота на експресия на Ki 67 при болни с метастазирал ТНKMЖ**

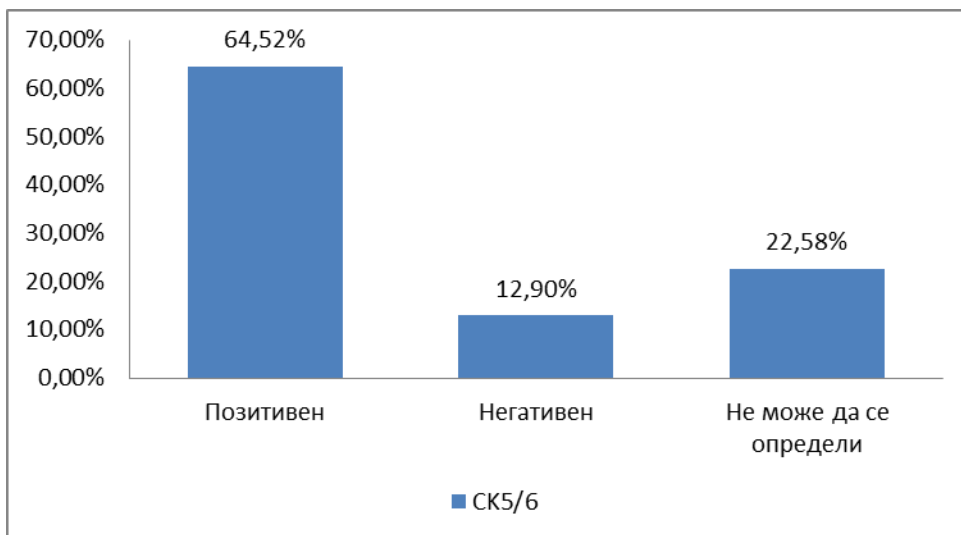


При изследване на експресията на Ki-67 се установява, че по-голямата част от болните са с ниска експресия: 58,07% от болните са с експресия по-малка от 14%, а само 34,48% са с експресия по-голяма от 14%. Тези данни не корелират с известната висока пролиферативна активност на ТНКМЖ, което би могло да се обясни с недостатъчния брой изследвани болни, както и видът на материала и приложената методика на изследване.

### 3) CK5/6

Изследването на базалните маркери cytokeratin 5/6 показва преобладаваща експресия в 64,5% от изследваните болни. Това доказва преобладаването на базалния тип ТНКМЖ при нашите болни.

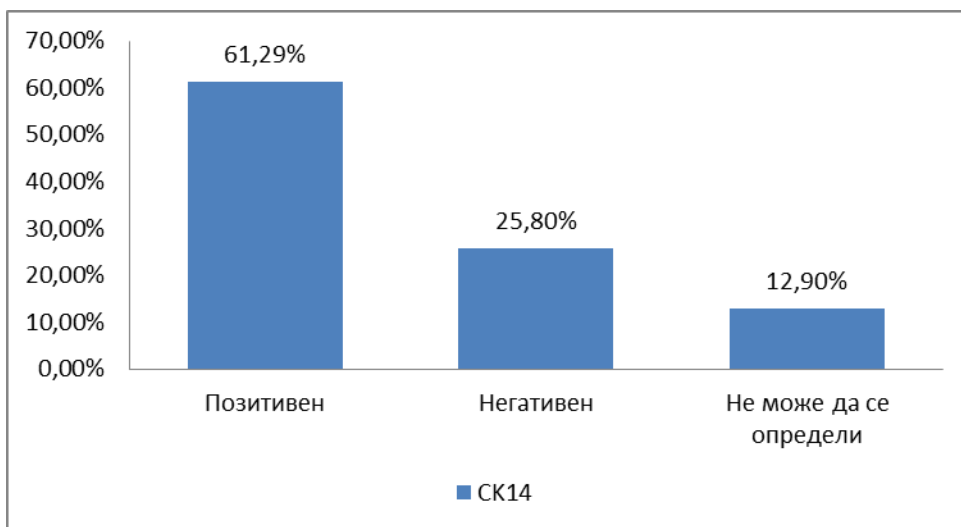
**Фиг. 20. Честота на експресия на CK5/6 при болни с метастазирал ТНКМЖ**



#### 4) CK 14

Анализът на друг базален маркер cytokeratin14 показва, че също преобладава честотата на базалния тип при изследваните болни с ТНKMЖ. С позитивен цитокератин14 са 61,3% от болните и само 25,8 % са с негативен.

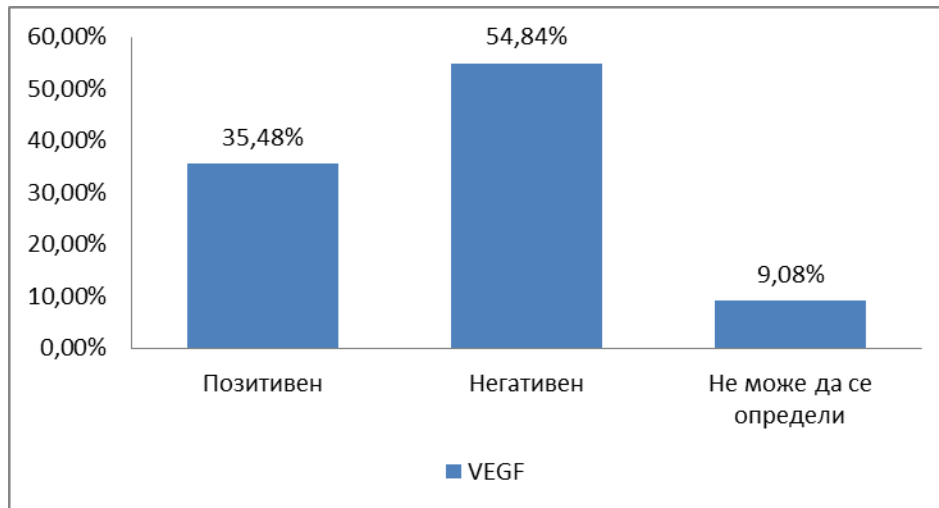
**Фиг. 21. Честота на експресия на CK14 при болни с метастазирал ТНKMЖ**



#### 5) VEGF

При изследване на честотата на васкуларния ендотелен растежен фактор се установява, че позитивирането е в 35,5% от изследваните болни.

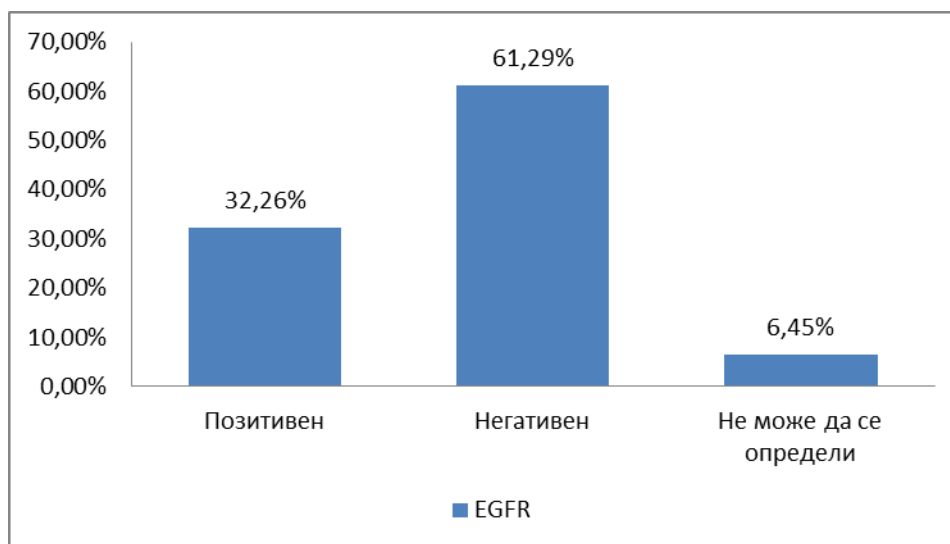
**Фиг. 22. Честота на експресия на VEGF при болни с метастазирал ТНKMЖ**



### 6) EGFR

При анализа на ендотелния растежен фактор се отбелязва, че позитивните болни са 32,3%, а негативните са значително по-висок процент - 61,3%.

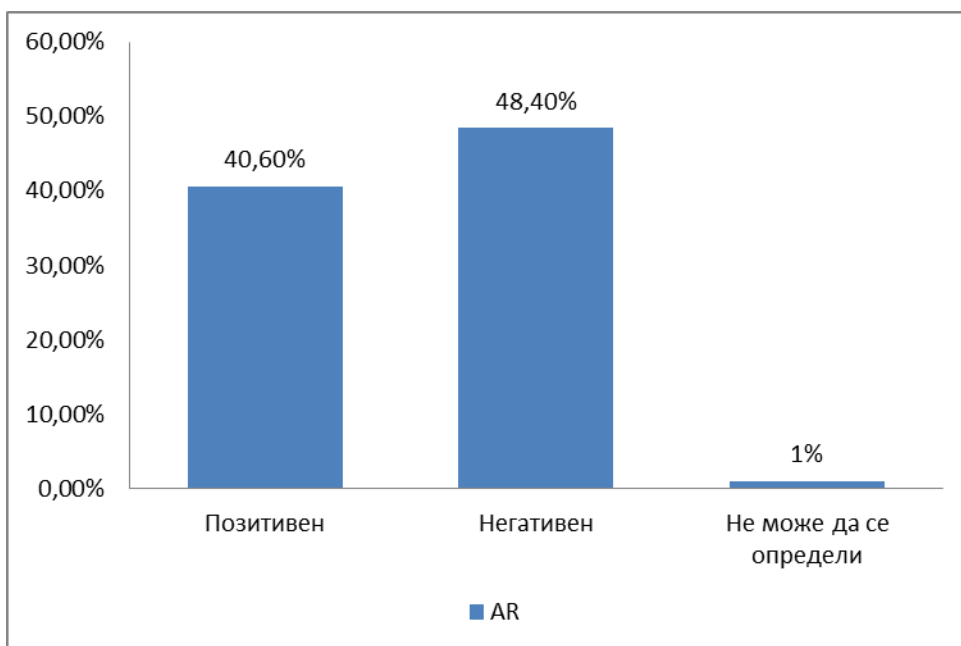
**Фиг. 23. Честота на експресия на EGFR при болни с метастазирал ТНKMЖ**



### 7) Андрогенни рецептори (AR)

Съотношението на болните с положителни и отрицателни андрогенни рецептори е приблизително еднакво. Болните с положителни рецептори са 41,6%, а тези с отрицателни - 48,4%.

**Фиг. 24. Честота на експресия на AR при болни с метастазирал ТНKMЖ**

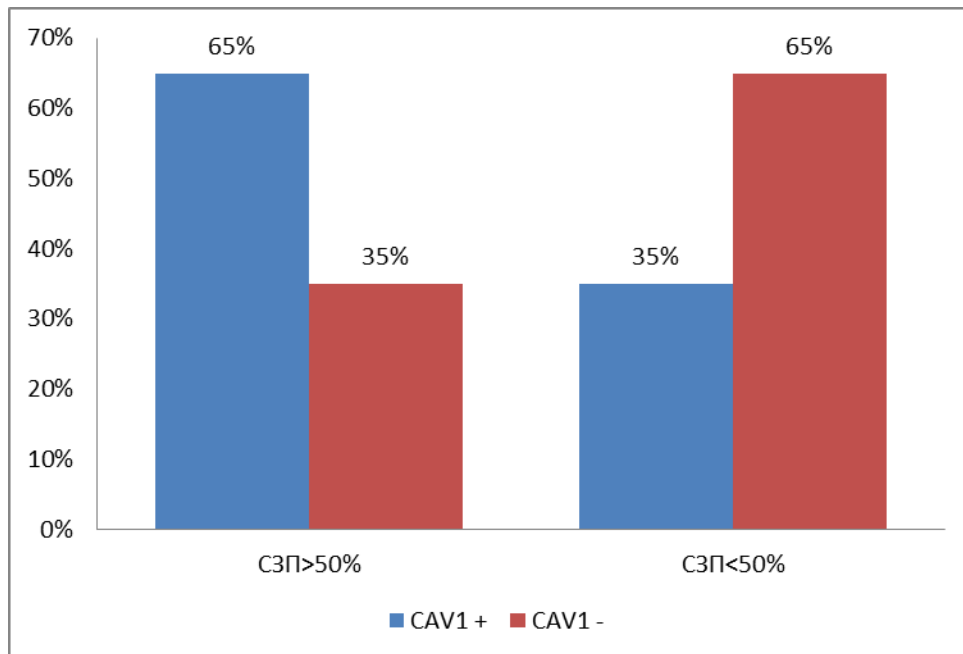


С оглед оценка на прогностичната стойност на молекулярните маркери болните се разделиха на две групи: с по-ниска (<50%) и по-висока (>50%) свободна от заболяване преживяемост. При тези две групи болни бяха съпоставени два от молекулярните маркера – CAV1 и AR.

Установи се, че групата болни с ниски стойности на свободна от заболяване преживяемост в 65,0% е с негативни стойности на CAV1 и в 35% - с позитивни стойности. Групата болни с висока свободна от заболяване преживяемост в 65% е с позитивен CAV1 и в 35% - с негативен, т. е. болните с добра прогноза във висок процент са с позитивни стойности на CAV1.

При разглеждане на процентното съотношение на AR в същите две групи се установи, че групата с ниски стойности на свободна от заболяване преживяемост в 45% са позитивни за AR и в 55% са негативни. При групата с по-висока свободна от заболяване преживяемост само 25% от болните са с негативни рецептори, но 75% са с позитивни AR. Експресията на AR е добър прогностичен фактор при болни с ТНКМЖ.

**Фиг. 25. Стойности на CAV 1 при проследените болни, сравнени със СЗП**



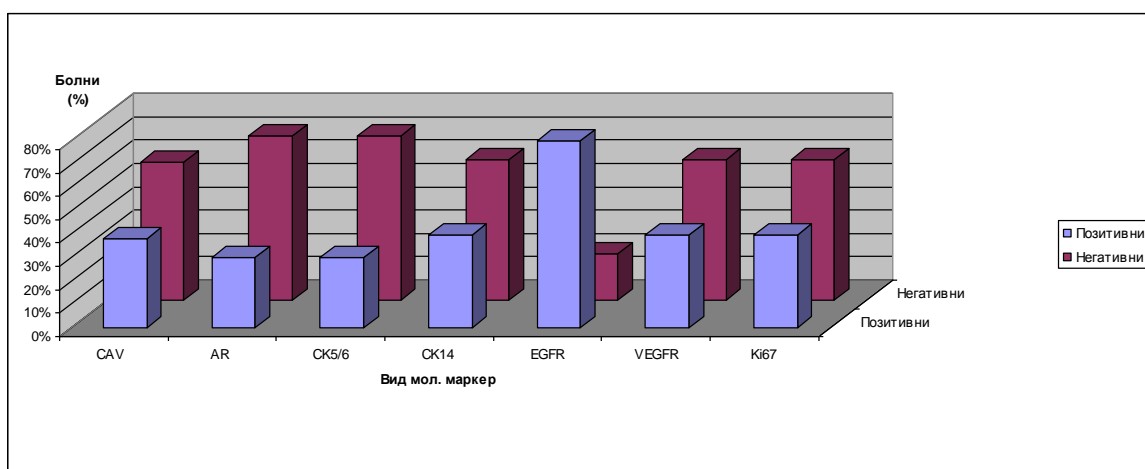
**Задача № 6:** *Определяне честотата на молекулярните маркери при група болни с доказана BRCA1 мутация с оглед косвена оценка на вида на тумора при невъзможност за провеждане на генетичен тест .*

Изследвани бяха 10 болни с доказана генетична мутация на BRCA1 за честота на разглежданите молекулярни маркери. От проведеното изследване, независимо от малкия брой болни, се установиха определени честоти.

**Табл. 17. Честота на изследвани 7 молекулярни маркера имунохистохимично при метастазирал ТНKMЖ с доказана BRCA1 мутация**

Молекулярни маркери	Позитивни	Негативни
CAV1	38. 4%	58. 9%
AR	30%	70%
CK5/6	30%	70%
CK14	40%	60%
EGFR	80%	20%
VEGF	40%	60%
Ki67	40%	60%

**Фиг. 26. Честота на изследваните 7 молекулярни маркери имунохистохимично при метастазирал ТНKMЖ с доказана BRCA1 мутация**



Извърши се сравнителен анализ на честотата на седемте молекулярни маркери между групата болни с недоказани BRCA1 мутации (63 болни) и тези от

групата с доказана мутация (10 болни). Установиха се следните зависимости: при жените без мутация 42.9% са с позитивен CAV1 и 54% - с негативен; при болните с мутация на BRCA1 - 10% са с позитивен CAV1, 90% са с негативен, като статистическа зависимост не се установява ( $P=0,018$ ).

При болните без BRCA1 мутация CK5/6 е позитивен при 28.6% и негативен при 55,6%, а при болните с мутация е позитивен при 30% и негативен при 70%. Отново не се установява статистическа зависимост ( $P=0,553$ ).

При изследване на VEGF резултатът сочи, че при жените без BRCA1 мутация маркерът се позитивира при 47,6% и е негативен при 44,4% от болните.

При болните с BRCA1 мутация VEGF е позитивен при 40%, негативен при 60% от тях. Между групите няма статистически значима разлика ( $p=0,668$ ).

При изследване на AR болните без BRCA1 мутация имат позитивни рецептори при 42,9%, при 50,8% те са негативни. При болните с мутация 30% са позитивни и 70% негативни. И при този анализ статистическа значимост липсва ( $p=0,622$ ), но е подчертана тенденцията високо рисковата група болни да са с ниска експресия на AR.

EGFR е позитивен при 30,2% и в 61,9% е негативен при болни без BRCA1 мутация; позитивен е в 80% и в 20% - негативен при болни с мутация. Установява се статистически значима зависимост между двете групи болни ( $p=0,015$ ). Тази зависимост трябва да се разглежда внимателно поради малкия брой болни с BRCA1 мутация.

Анализът на CK14 показва, че при немутиралите болни 23,8% са позитивни и 68,3% са негативни. При мутиралите 40% са позитивни и 60% са негативни при статистически незначима зависимост ( $p=0,515$ ).

Ki 67 в 61,9% е над 14% и в 28,6% - под 14% при немутиралите болни и в 40% над 14% и в 60% - под 14% при мутиралите болни. Не е установена статистическа зависимост при сравнителния анализ ( $p=0,153$ ).

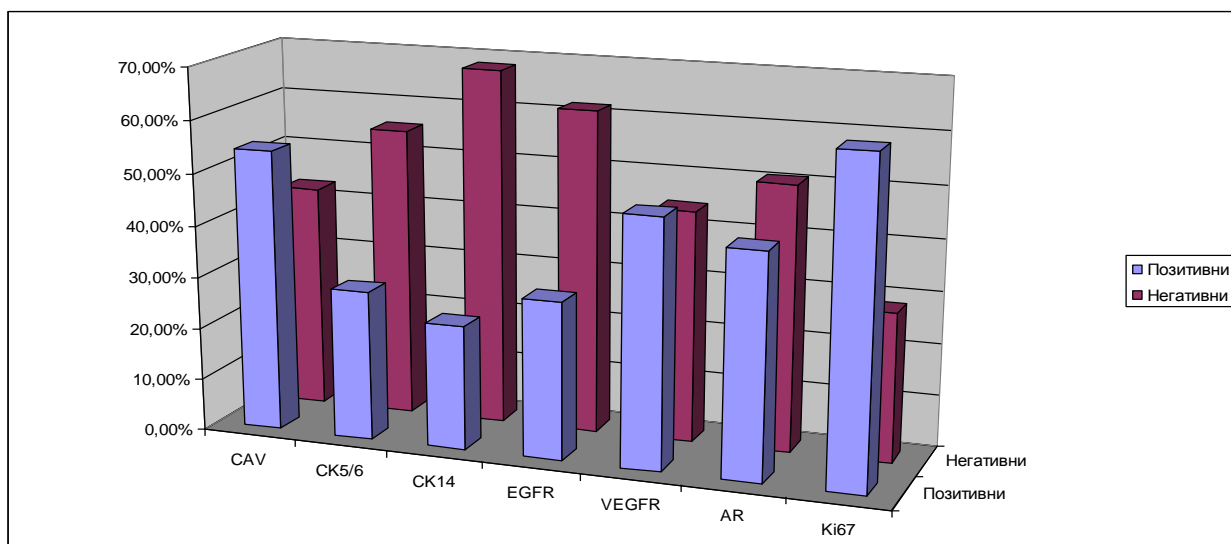


Установиха се зависимости на честотата на молекулярните маркери при наличие или липса на BRCA1 мутация.

**Табл. 18. Честота на изследвани 7 молекулярни маркери имунохистохимично при метастазирал ТНKMЖ с доказана BRCA1 мутация**

Маркери	BRCA1- неизследвани		BRCA1- мутирани	
	Позитивни	Негативни	Позитивни	Негативни
CAV1	54, 0%	42, 9%	38, 4%	58, 9%
CK5/6	28, 6%	55, 6%	30%	70%
CK14	23, 8%	68, 3%	40, 0%	60%
EGFR	30, 2%	61, 9%	80, 0%	20, 0%
VEGF	47, 6%	44, 4%	40, 0%	60, 0%
AR	42, 9%	50, 8%	30%	70%
Ki67	61, 9%	28, 6%	40, 0%	60, 0%

**Фиг. 27. Честота на изследвани 7 молекулярни маркери имунохистохимично при метастазирал ТНKMЖ с доказана BRCA1 мутация, сравнени с болни, неизследвани за BRCA1 мутация**



Подчертаната хетерогенност на ТНКМЖ, както и на останалите подтипове РМЖ, се дължи до голяма степен на генетичните мутации.

Изследването им към настоящия момент не се провежда рутинно, а само при 1-4% от всички случаи с рак на гърдата. То се препоръчва предимно при млади жени с фамилна обремененост. През настоящата година беше предложен скрининг при пациентки с ранен ТНКМЖ с оглед идентифициране на носителите на BRCA1 мутация при кавказката раса. Мутацията е най-разпространена при базалния тип карцином, ER негативни тумори с висока експресия на CK 5/6, CK14, както и при загуба на някои тумор-супресорни гени. Около 50% от жените с рак на гърдата и с фамилна анамнеза могат да имат BRCA1, BRCA 2 мутации. При болните с ТНКМЖ в по-млада възраст, особено под 40 години, в 10% от случаите се установяват мутации. Целта на някои от настоящите проучвания е да се изясни дали ТНКМЖ е независим критерий за стратификация на жени с повишен риск от наличие на BRCA1 мутация и да се определи необходимостта от имунохистохимично изследване. Търси се отговор на въпроса дали имунохистохимичната характеристика може да помогне за определяне на подгрупата жени, които вероятно са с герминативна мутация в BRCA1 (Sze-Yee P.1 et all. 2012) . В клиничното проучване са включени 431 болни, от които 110 са с ТНКМЖ на възраст между 36-50 години. Установява се, че при 28,0% от жените с ТНКМЖ и фамилна анамнеза има мутация, като тази честота при липса на фамилна анамнеза е доста по-ниска - 9,9% ( $p < 0,0001$ ).

В нашия анализ болните с доказана BRCA1 мутация бяха допълнително изследвани имунохистохимично за честота на разглежданите 7 молекулярни маркери, имайки предвид, че в тези случаи туморите са предимно с базален фенотип. Установихме, че базалните маркери CK5/6 и CK14 показват по-нисък процент на изява при немутиралите видове (30-40%). Налице са сигнификантно значими положителни стойности при експресията на EGFR (80%) - другият важен базален маркер.

Едно от големите проучвания за търсене по косвен път на мутация на BRCA1 гена чрез извършване на имунохистохимичен анализ е на Genetic Study ( MyBrCa-2003-2012 ) при 1454 болни. Болните са на възраст под 35 години без и с фамилна анамнеза за ТНKMЖ, изследвани за BRCA1 мутация, както и за CK5/6, CK14 и PTEN. За позитивни за цитокератини се приемат клетки с повече от 10% интензивност на оцветяването. Направени са изводи, че съобразно възрастта, тройно негативния тип, фамилната анамнеза, рискът е с 2.6 - 3.5 пъти по-висок за BRCA1, 2 мутация, особено при възраст под 35 години. Тези данни не се отнасят за болни на възраст между 36-50 години особено без фамилна анамнеза. Оттук следва, че млади жени под 35 г. с посочените имунохистохимични белези имат по-висок риск за BRCA1, 2 мутация, отколкото тези на възраст 40-50 г. особено без фамилна анамнеза.

EGFR като основен маркер на базалния тип се експресира при ТНKMЖ в около 45-70% (Brows F., et al. 2010) . В нашия анализ неговата честота при BRCA1-мутиралите тумори е висока - 80%, тя е и статистически значима ( $p=0,015$ ). Този маркер има отношение както за определяне типа ТНKMЖ, така и за прицелната терапия. В тази насока опитът не е голям, както и резултатите от клиничните изпитвания. При добавяне към терапията с карбоплатина на моноклоналното анти тяло цетуксимаб, отговорът е 17 %, т. е. това лечение е от полза при малък брой болни. Друго проучване – Oncology 2252200 trial на O'Shaughanessy J. et. al., 2010 констатира, че добавянето на цетуксимаб към карбоплатина или иринотекан води до по-висок процент клинични ремисии (49% срещу 30%), докато при СПП няма особено подобрене (5,1 месеца срещу 4,7 месеца). Подобни са и изводите от друго клинично изпитване II фаза за скромната полза от добавянето на цетуксимаб при

лечение на ТНKMЖ за подобряване на ПБП и незначителните ползи за честота на клиничните ремисии (20% в сравнение 10,3%), ( $p=0.11$ ) - (Baselga J., et al. 2010г).

В нашата група болни 58,9% са с негативен CAV1.

Това корелира с базалния тип и съответно с по-неблагоприятната прогноза при ТНKMЖ с наличие на BRCA1 мутация. CAV1 е маркер, пряко свързан с базалния тип КМЖ. По-задълбочен анализ в тази насока е проведен от Witkiewicz A., et al., 2010 (Department of Pathology, USA) при 85 болни с ТНKMЖ. Проследява се средната обща преживяемост, като при наличие на позитивни стойности на CAV1 тя е по-висока, докато при болни с негативни стойности на CAV1 е по-ниска. Болните с позитивни стойности имат 5-годишна преживяемост 75%. Изводът е, че този биомаркер има основна прогностична стойност по отношение на СЗП и ОП. Трябва обаче да се вземе под внимание и експресията на базалните цитокератини - CK5/6, CK14, на EGFR, ki67, p53. В това, както и в някои други проучвания се констатира, че намаляването на CK5/6, +/- EGFR и загуба на CAV1 са лош прогностичен фактор за базалния фенотип. В подкрепа на тези твърдения е и анализът на Calvalho F. et al., 2010 (Department of Pathology, Brazil), според който повишени CK5/6 и EGFR се срещат по-често при по-млади жени: CK5/6 - 42,1%, сравнено с 9,6% при по-възрастни, EGFR - в 71,6% позитивен при младите, а при възрастни болни - 47,3%.

Нашето изследване на честотата на молекулярните маркери при болни с BRCA1 мутация или без такава цели търсене на определени прогностични репери при ТНKMЖ. В подкрепа на това е и изследването на 1944 болни в Department of Hystopathology. Те проследяват AR, EGFR, E-cadherin, CK5/6, 14, p53, като формират т. нар. *Nottingham Prognostic index*, състоящ се от стойности на AR, E-cadherin, basal-тип, EGFR. Взети са под внимание и размерът на тумора, както и ангажираните лимфни възли. Основният извод е, че позитивните лимфни възли и базалният тип са основни прогностични маркери, като се вземат под внимание и други параметри, като възраст, грейдинг, размер на тумора, васкуларна инвазия и др.

AR са позитивни в нашето изследване в 30% при налична BRCA1 мутация. Тези резултати са в корелация с данните от анализа на Pristan и кол. 2010г., където

при 30% от BRCA1 мутиралите тумори се установяват положителни AR рецептори. В 78% от тези с положителни AR са при BRCA1 - несвързаните тумори.

Изследвайки AR може да се направи извод за СЗП и ОП при болни с ТНKMЖ. Тези данни са потвърдени от анализи на различни колективи като Loibl S. et., all. Проследени са 673 болни, като се констатира, че при AR(+) СЗП е 78,9%, докато при AR(-) е 72,5%; ОП – 88,8% при AR(+), сравнена с 82,7% при AR(-). Подобни са изводите и на He J., et all. 2011, които установяват, че при AR (+) ОП и СЗП са по-високи.

Определянето на стойността на AR е предимно с прогностична цел, но има отношение и към чувствителността към антиандрогенна терапия. То е обект на изследване освен от провежданото клинично изпитване с бикалутамид, така и с друг агент - абиратерон ацетат (CB7598), селективен и необратим инхибитор на CYP17. Той е с доказана ефективност при кастрационнорезистентни тумори на простатата. Понастоящем медикаментът се проследява за ефективност в I и II фаза при карцином на гърдата с ER+/- и AR+ тумори.

В нашето проучване беше анализирана честотата на посочените седем молекулярни маркери при болни с метастазирало заболяване, при които няма изследване за мутация на BRCA1. Поставихме си за цел да определим кои от тях биха могли да се използват като най-чувствителни, за да участват в прогностичния панел на болните с ТНKMЖ.

На първо място поставихме маркера CAV1 с честота 83,9%. Изследвано бе интратуморното ниво на този мембранен протеин. Високата му честота показва, че изследваните от нас болни са предимно с базален тип. Ниската експресия на CAV1 води до лоша прогноза по отношение на ранни рецидиви и метастази, кратка обща преживяемост, което в нашия анализ напълно съответства на получените данни - тези болни са с метастазирало заболяване.

Стойностите за базалните цитокератини в нашия анализ са съответно: CK5/6 - 64,5%, CK14 - 61,29%. Тези данни сочат, че при изследваните от нас болни базалният тип ТНKMЖ заема значителен дял. Съпоставими са данните, получени при нашето изследване и за VGFR - 35,46% и EGFR-експресия - 32,3%. Тези данни са в непосредствена връзка с изводите, които могат да се направят за вида ТНKMЖ,

при потвърждаване или изключване на наличния базален тип. Според данните от изследванията за VEGFR в литературата е установено, че интратуморните нива при ТНKMЖ, сравнени с неТНKMЖ, са съответно 34% и 6%. Тези и редица други подобни изводи са основа за проследяване на ефекта от ангиогенната терапия при този тумор. Експресията на биомаркери като CK5/6, EGFR както и други от миелоепителните клетки води до дегенерация на различни кинази, включително и PTEN, както и загуба на активността на АКТ-пътя. Тези промени са в непосредствена връзка с експресията на EGFR, VEGFR, AR, както и с високи нива на stem cells (CK44+, CD24-/low) (Park и кол.)

Разделянето на ТНKMЖ на базален и небазален тип е в резултат на различната генна експресия. Базалният тип представлява интерес поради високата си честота, засягане на млади жени, липса на ефективна терапия, лоша изходна прогноза. На базата на генетичен анализ идентификация на ТНKMЖ с базален тип не може да се извършва. Публикуваните анализи от големи клинични изпитвания (GEICAM/9906; Ma5; Ma12), използвайки PAM50 (Percent of Accepted mutations 50), QRT-PCR ( Quantitative reverse transcriptase-polimerase chain reaction ) базиран анализ показват, че 30% от ТНKMЖ не са базални, т. е. налице е значителна хетерогенност вътре в самата група. Проблем за диагностиката е разминаването в данните от имунохистохимичния и генетичния анализ, което може да се дължи на факта, че изследванията са извършени от 2 различни зони на тумора. Има области, богати на ER и HER2, други са по-бедни, т. е. говори се за интратуморна хетерогенност. Друга причина за несъответствието е, че генната експресия и имунохистохимично - базираният анализ се измерват с брой свързани гени, сравнен с 3 отделни патологично-базирани маркери, които определят ТНKMЖ. От друга страна, идентифициране на мутации в десетки до стотици гени може по-добре да улови истинския биологичен профил на тумора в сравнение с 3 или 4 маркера. Трябва да се има предвид описания през последните години още един вид - Claudin low, който също е с базален профил, с метапластична и медуларна характеристика и лимфоцитна инфилтрация в 37% от случаите. По-точното определяне на типа ТНKMЖ, независимо по какъв механизъм се извършва, води до по-правилна терапевтична стратегия. В тази насока е и наличната разлика в имуноклетъчните характеристики на клетките, което е важно от клинична и биологична гледна точка,

както и наличие на CD8+T-клетки като по-добър белег за резултат от лечението при тези болни. Това е в непосредствена връзка с прилагане на имунонасочената терапия като например PD-1/PDL-1. Наличието на имунни инфилтрати може да бъде логично място за първа цел на тези нови терапии.

*Обобщение: От изследването на панел от 7 молекулярни маркери се оказва, че честотата им не се отличава значително от общо констатираната за ТНKMЖ. Не може да се обясни причината за много ниските нива на Ki67 при нашата група болни. Наличната експресия на Caveolin 1 в значителен процент от болните би могла да бъде добър прогностичен показател. Изследването на AR може да се използва както за маркер за прогноза, така и за чувствителност към лечение (предиктивен маркер). Значителната експресия на базалните цитокератини показва, че преобладава базалният тип ТНKMЖ, но е налице и подчертана хетерогенност при този тумор, т. е. наличие на базални и небазални типове. Набелязаната висока честота на базалните маркери при болните с доказана BRCA1 мутация независимо от малкия им брой сочи, че при болните с лоша прогноза базалният фенотип е водещ. Биха могли да се направят косвени изводи при липса на възможност за генетично изследване, за предполагаема мутация при млади жени, наследствено обременени и с имунохистохимичен облик на базален тип тройно негативен карцином.*

Изложените факти водят до извода, че ТНKMЖ е един от най-агресивно протичащите подтипове карцином на млечната жлеза. Задълбоченото му изследване би довело до детайлизиране на неговата молекулярно-биологична характеристика и би подобрило ефекта от лечението и прогнозата.

Отдиференциране на най-важните прогностични фактори в клиничко-патологичен аспект е в основата на успеха от лечението. Генетичният анализ е най-авангардното изследване не само при този тумор. Той доказва, че причината за голямата палитра от изменения се дължи на богата гама от генетични промени. След въвеждане на масовото приложение на нови технологии за генетичен анализ, би могло да се изработи прогностична карта за всеки пациент, предвиждаща вероятността от рецидив за повече от 10 години. Този момент би бил революция в

диагностиката с пряко отношение и към терпийта на тези болни. Дотогава се налага да се вземат под внимание основни прогностични фактори, чрез които да се определи най-екзактното диагностично и терапевтично поведение.

Установената голяма хетерогенност в групата на тройно негативния карцином на млечната жлеза води до много препятствия в неговото лечение. Изследването на нови и нови молекулярни белези довежда до оформяне на нови подтипове тумори. Това обаче затруднява още повече както диагностиката, така и лечението. Налага се да се търсят начини за обединяване на подтиповете, търсене на по-изразени белези в отделните групи, също и тяхното обединяване, а не разделянето им. От това следва, че вниманието трябва да се насочи към някои точно определени маркери за ТНКМЖ, които имат както прогностична, така и предиктивна стойност. До момента не са точно определени такива, което налага непрекъснатото изследване и анализиране на болните с този вид тумор. Прецизната диагностика е най-правилният път към адекватното и точно лечение. Тя е и една от първите стъпки към индивидуализиране на терапията.

Тройно негативният карцином на млечната жлеза се характеризира с висока химиочувствителност.

Към настоящия момент стандартната химиотерапия намира основно приложение при лечението в комплекс с останалите методи. Предстои изясняване на необходимостта от локален контрол чрез провеждане на следоперативна радиотерапия при тумори с малки размери и проведена радикална мастектомия. В сегашните насоки лечението на ТНКМЖ не се отличава от това на другите типове рак на млечната жлеза. При ТНКМЖ няма установени стандарти за адювантна, неоадювантна и терапия за метастазирало заболяване. С оглед на агресивната му природа - ранни рецидиви, бързо метастазирание в първите 3 години от диагнозата, по-кратка обща преживяемост, приложението на адювантна химиотерапия е необходимо. Това води до удължаване на свободния от заболяване интервал, както и повлиява общата преживяемост. Особено показателен е този факт при сравняване на болни, провеждали или изобщо не провеждали адювантна химиотерапия. Антрациклините са с неоспорим ефект при постигане на тази цел. Резултатите от



комбинацията на антрациклин и таксан е с приоритет пред останалите режими особено при болни с по-лоша прогноза.

Наложителен е и правилен подход към избора на първа линия химиотерапия за метастазирало заболяване. Приложението на комбинацията на таксан и ангиогенния инхибитор бевацизумаб е с доказан ефект, с предвидим и приемлив профил на безопасност. Това заключение е отразено и в резултатите на няколко големи европейски проучвания.

Получените от нас резултати по отношение на прогностичните фактори определят най-важните от тях: размер на тумора, наличие на метастази дори в 1 лимфен възел, степен на малигненост.

Установените резултати от проведената адювантна химиотерапия по отношение на продължителността на свободния от заболяване интервал е съпоставима с докладваните в литературата данни. Потвърждава се предимството от приложение на антрациклин – съдържащи режими и антарциклин-таксан комбинирани режими. Постигнатата свободна от заболяване преживяемост при групата болни, провели това адювантно лечение, съответства на данните от литературата.

Прилаганата в нашето проучване първа линия химиотерапия - комбинацията таксан + бевацизумаб, показва резултат по отношение на средната преживяемост без прогресия, съответстващ на резултатите от проведените до момента клинични изпитвания. Липсата на значима токсичност прави тази комбинация предпочитана за първа линия терапия на метастазирал тройно негативен карцином на млечната жлеза.

Както в големите европейски проучвания, така и в нашето, не може категорично да се посочат най-прецизните биомаркери за прогноза и насока за лечение. Тези маркери идват в съображение при колебание в диагностичния подход и избора на терапевтично поведение. Те могат да помогнат и тогава, когато алтернативите за лечение при болни с тройно негативен карцином на млечната

жлеза са изчерпани. Тези изследвания са един от етапите преди създаване на стандарти за диагностика и лечение на ТНКМЖ.

С оглед посочените особености на ТНКМЖ и с цел оптимизиране на неговата диагностика и лечение предлагаме следния алгоритъм:

***Примерен диагностичен и терапевтичен алгоритъм при болни с ТНКМЖ***

1. Диагностика на тумора – мамография/ехография, при показания – ЯМР.
2. Биопсично изследване за хистологична верификация, изследване на ER, PR, HER2 статуса.
3. Ренгенография на бял дроб, ехография на коремни органи, костна скintiграфия за стадиране за заболяването.
4. Неоадювантна терапия, ако стадият на заболяването налага провеждането и.
5. Оперативно лечение - мастектомия или органосъхраняваща операция с аксиларна лимфна дисекция.
6. Имунохистохимично изследване на биопсичния материал с оглед определяне типа ТНКМЖ: базален или небазален тип, хистологичен вид, степен на малигненост. При невъзможност - само хистологично изследване.
7. Изследване на рецепторен статус- ER, PR, HER2, с оглед потвърждаване на тройно негативния тип (IHC, CISH, FISH).
8. При възможност - изследване на BRCA1 мутация, особено при налична фамилна обремененост, млада възраст и базален тип.
9. Провеждане на адювантна терапия:
  - 1) Химиотерапия:
    - При тумор под 2 см без ангажиране на лимфни възли T1N0M0 - приложение на адювантна химиотерапия с антрациклин – 3 курса,

последван от Доцетаксел – 3 курса или 12 седмични вливания Паклитаксел. При противопоказания за лечение с антрациклини те се заменят с комбинацията CMF.

- При болни с позитивен дори 1 лимфен възел – 4 курса ФЕК + 4 курса Доцетаксел
- За определяне на вида химиотерапия при малки тумори и негативни лимфни възли се препоръчва имунохистохимично изследване на молекулярни маркери – CAV1, Ki67.

2) Радиотерапия - задължителна при квадрантектомия и тумори над 2 см, обсъждане при по-малки от 2 см тумори, при които е проведена мастектомия. Провеждането и следва адювантната химиотерапия.

10. Проследяване на болните - препоръчва се интервалите през първите 3 години да са 3-4 месеца, с оглед на високия риск от рецидиви и метастази.

11. При доказване на метастазирало заболяване:

1) Провеждане на биопсично изследване и нов рецепторен статус за потвърждаване или отхвърляне на тройно негативния тип.

2) Оперативно и лъчелечение при необходимост (локален рецидив).

3) Провеждане на първа линия химиотерапия за метастазирало заболяване - препоръчва се комбинацията на таксан + бевацизумаб.

12. При избор на втора и трета линия химиотерапия за предпочитане са таксани, капецитабин, ерибулин, нови таргетни агенти (в момента в клинични проучвания), PARP-инхибитори и Ixabepilone след регистрация.

При липса на алтернатива или налична токсичност - изследване на експресията на AR и преценка за лечение с антиандрогени (бикалутамид) в рамките на клинични проучвания.

## V. ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. ТНКМЖ засяга жени предимно във възрастта на перименопаузата.
2. При тумори с размер, равен или по-голям от 2 см, честотата на метастазиране е по-висока в сравнение с тази при по-малки от 2 см тумори.
3. По-големите от 2 см тумори метастазират по-често в лимфни възли, което води до повишаване на риска от далечно метастазиране.
4. Преобладаващата степен на малигненост е G2-3, което не корелира с риска от метастазиране.
5. Преобладаването на органното метастазиране е резултат от хематогенна дисеминация, свързано е с по-лоша прогноза. Това налага по-стриктно проследяване на болните с ТНКМЖ, включително и провеждане на MRI на главен мозък.
6. Изследването за BRCA1 мутация е желателно при млади жени, наследствено обременени с имунохистохимично доказан базален тип ТНКМЖ.
7. Провеждането на адювантна химиотерапия подобрява свободния от заболяване интервал. Тенденцията за най-дълъг светъл период при комбинацията антрациклин + таксан прави тази комбинация предпочитана особено при наличие дори на един лош прогностичен фактор.
8. При малки тумори и негативни лимфни възли за уточняване на терапията в съображение биха могли да влязат стойностите на високо чувствителни молекулярни маркери, като CAV, KI67, базални цитокератини.
9. Комбинацията на таксан и бевацизумаб е за предпочитане като първа линия химиотерапия за метастазирало заболяване.
10. Изследване на експресията на AR с оглед опит за лечение с антиандрогени в рамките на клинични проучвания. Тяхната стойност може да се използва и като прогностичен маркер.

ТНКМЖ е хетерогенно заболяване, налагащо по-екзактно класифициране в бъдеще. Понастоящем са идентифицирани няколко подтипа, като базалният несъмнено е най-чест. Молекулярните методи и генната експресия, секвенирането на ДНК може да подпомогнат подразделянето на ТНКМЖ в повече биологични подгрупи. Бъдещи клинични изпитвания ще определят потенциалните ползи от тяхното идентифициране. Агресивното протичане на този тумор задължително изисква провеждане на химиотерапия дори и при по-малки тумори, като комбинациите трябва да включват антрациклини и таксани. Лечението на метастазиралото заболяване е предизвикателство, добавянето на ангиогенни инхибитори към терапията на този етап е преимущество. За оптимизиране на лечението на това заболяване са необходими много допълнителни изследвания и анализи. Всяка научна разработка и анализ с обект ТНКМЖ би била полезна както в теоретично, така и в практическо отношение.

***Изследванията могат да продължат в посока на:***

1. Отчитане на нови прогностични фактори при ТНКМЖ с оглед по-ясната стратегия при решаване на диагностичното и терапевтично поведение.
2. Проследяване ефекта от лечение при болни с малки тумори и негативни лимфни възли при провеждане на адювантна химиотерапия с антрациклин и таксан.
3. Преценка за провеждане на следоперативна терапия с оглед подобряване на локалния контрол предвид ранните рецидиви в първите 3 години от диагностиката.
4. Изследване на нови молекулярни маркери, както и разглежданите в настоящото изследване с оглед използване на тяхната прогностична и терапевтична стойност.
5. Разширяване групата болни с доказана BRCA1 мутация и корелация с експресията на определени молекулярни маркери.

6. Изясняване на причините за констатираните ниски нива на Ki67 при проследените болни, несъответстваща на високата пролиферативна активност при ТНКМЖ.

7. Проследяване на ранните и късните токсични ефекти при провеждане на първа линия химиотерапия с комбинацията таксан и бевацизумаб.

9. Проследяване ефекта от лечението при прилагане на нови схеми за лечение на метастазирал ТНКМЖ.

7. Доразработване възможностите за лечение с антиандрогени при болни с изразени токсични ефекти от стандартните химиотерапевтични агенти и при липса на други алтернативи за лечение.

## **VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Оптимизиране на диагностичния подход при тройно негативния карцином на млечната жлеза чрез определяне на панел от молекулярни маркери.

2. Оптимизиране на терапевтичния подход при болните с ТНКМЖ чрез въвеждане приложението на молекулярни маркери за определяне на съответния подтип тумор.

3. Чрез анализ на основните молекулярно-биологични характеристики на ТНКМЖ се дава насока за максимално ефективно адювантно лечение и лечение на метастазирал ТНКМЖ.

4. Създаване на детайлизиран диагностичен и терапевтичен алгоритъм при ТНКМЖ.

5. Предлага се косвена оценка на вида на тумора при невъзможност за провеждане на генетичен тест чрез определяне честотата на молекулярните маркери.

## **VII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

**1.Таушанова** М., Н. Митева, С. Вълев, К. Тимчева. Свободен от заболяване интервал при болни с тройно негативен карцином на млечната жлеза. Онкология 2007, 2: 29-31.

**2.Таушанова** М., К. Тимчева, С. Вълев. Особенности в лечението на тройно негативния карцином на млечната жлеза. Онкология 2010, 2: 53-58.

**3.Таушанова** М., К. Тимчева, С. Вълев. Биологични възможности за лечението на тройно негативния карцином на млечната жлеза “, Онкология 2011, 1. 60-63.

**4.Таушанова** М., К. Тимчева, С. Вълев. Основни биологични и молекулярни характеристики на тройно негативния карцином на млечната жлеза” Онкология, 2010, бр. 4.

**5. Taushanova** M., K. Timcheva, S. Valev, E. Aleksandrova. Biological and molecular characteristics, diagnosis and treatment of triple negative breast cancer .ScienceMED an International Journal of Medical Sciences, Jun. 2013, p73-78.

### **Участие в научни форуми с публикувани резюмета**

1. Taushanova M., S. Valev, C. Timcheva. Disease-free survival (DFS) in patients with triple negative breast cancer” Annals of Oncology, suppl. 9, Abstract book ESMO Conference Lugano (ECLU), 5-8July, 2007 Lugano, Switzerland, 30P, IF6. 43.

2. Taushanova M., N. Dimitrova, I. Gavrilov. Characteristics of Molecular Breast Cancer Subtypes Among Bulgarian Women. Poster 235. EJC, vol. 48, Supplement, 2012.

3. Valev S., K. Timcheva, M. Taushanova, V. Marinova, I. Trifonova, E. Krasteva, G. Kurteva. Frequency of different prognostic factors and disease free survival in patients with metastatic breast cancer. J of BULON, 2006.

## **УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ**

1. Връзка между нивата на циркулиращи ракови клетки (ЦРК), измерени посредством полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция при пациенти с метастазирал карцином на млечната жлеза и клиничния ход на заболяването. Съвместен научен проект към ФНИ с Националната генетична лаборатория, участници д-р Вълев, доц. Тимчева, д-р Таушанова.

2. Изследване на генетични, геномни и епигенетични промени при рак на гърдата и приложението им за ранна диагностика, прогностични и индивидуализиране на терапията. Съвместен научен проект към ФНИ с Националната генетична лаборатория, участници д-р Таушанова, доц. Тимчева, д-р Вълев.

3. Анализ на мутации в BRCA1гена при българската популация с тройно негативен карцином на млечната жлеза, Договор 47, 2011, СМН, МУ-София, Ръководител Доц. С. Христова, -2011-2012. Участват д-р Таушанова, доц. Тимчева, д-р Вълев.

4. Проследяване на нивата на циркулиращите туморни клетки (ЦТК) при болни с метастазирал карцином на гърдата – прогностично и предиктивно значение,



договор ДДВУ 02/35/2010, ФНИ, МОМН, ръководител гл. асистент д-р А. Миткова, 2010-2013, участват д-р Таушанова, проф. Тимчева, д-р Вълев.

## **VIII. БЛАГОДАРНОСТИ**

Благодаря на всички мои учители и колеги за съдействието, което ми оказаха през годините на моята работа.

На първо място отправям благодарност към моя най-голям учител проф. Д-р Константа Тимчева и всички колеги от Клиниката по химиотерапия. Без съдействието на всички тях тази разработка не би била възможна. Благодаря на проф. Генова, на доц. Вуков, на колегите от патоанатомична лаборатория, на целия екип на Националната генетична лаборатория, Раковия регистър и ръководството на болницата.

Благодаря на моя съпруг и дъщерите ми за безкрайната подкрепа, търпението през целия период на подготовката и оформянето на дисертационния ми труд.